

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PHOSPHORYLIERUNG VON
MYOSIN BEI DICTYOSTELIUM

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wolfgang Baltes

am

5. April 1983



awi-druck
Dissertations-Druck
Müllerstraße 22 · München 5
Telefon 260 40 05

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PHOSPHORYLIERUNG VON
MYOSIN BEI DICTYOSTELIUM

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wolfgang Baltes

am

5. April 1983

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1983

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1979 bis September 1982 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Gerisch in der Abteilung "Zellbiologie" des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried ausgeführt. Dafür, daß er mir die Gelegenheit dazu gab, möchte ich mich hier nochmals bei Herrn Prof. Gerisch bedanken.

Herrn Dr. Maruta, der mir während dieser Zeit eine permanente Hilfe und Stütze war, möchte ich dafür und für alles, was ich von ihm gelernt habe besonders danken.

Myosin und MHC-Kinase aus vegetativen Dictyostelium Amöben, sowie Myosin aus Physarum Plasmodien wurden mir von Herrn Maruta zur Verfügung gestellt.

Allen Angehörigen der Abteilung "Zellbiologie" danke ich für Rat und Tat, mit denen sie mir zur Seite standen.

Herrn Dr. G. Isenberg danke ich für das Überlassen von Kaninchen-Muskelactin.

Herrn Dr. W. Huttner danke ich für die Einführung in die Phosphopeptidanalyse.

Herrn Dr. F. Lottspeich danke ich für die quantitative Aminosäureanalyse.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3
III. Material und Methoden	10
III.1. Material	10
III.2. Zellkultur	10
III.3. Gewinnung von Myosin aus aggregations= reifen Zellen	11
III.4. Bestimmung der ATPase-Aktivität	14
III.5. Nachweis und Bestimmung der Kinase- Aktivitäten	14
III.6. Vorreinigung der MHC-Kinase II	15
III.7. Phosphatbestimmung	17
III.8. Phosphoaminosäurebestimmung	18
III.9. Phosphopeptidanalyse	19
III.10. Begrenzte Chymotrypsin-Spaltung von Myosin	20
III.11. Herstellung von Myosin-Sepharose zur Affinitätschromatographie	20
III.12. Herstellung eines F-Actin Affinitäts= materials	21
III.13. Proteinbestimmung	22
IV. Ergebnisse	23
IV.1. Reinigung von Myosin	23
IV.2. Aminosäurezusammensetzung von <u>Dictyoste=</u> <u>lium</u> -Myosin	26
IV.3. Partielle Reinigung der MHC-Kinase II	29
IV.4. Stöchiometrie der Myosin-Phosphorylierung	35
IV.5. Spezifität der MHC-Kinasen	36

	Seite
IV.6.	Phosphoaminosäureanalyse
IV.7.	Phosphopeptidanalyse
IV.8.	Anzahl der Phosphorylierungsstellen
IV.9.	Eigenschaften großer phosphorylierter Myosin-Fragmente
V.	Diskussion
VI.	Anhang
VII.	Literaturverzeichnis
VIII.	Abkürzungsverzeichnis
IX.	Lebenslauf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0078

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die beiden Hauptproteine der Muskelzellen - Actin und Myosin - sind in den letzten Jahren in einer Vielzahl von Nichtmuskelzellen gefunden worden. Der Aufklärung der Zusammenhänge zwischen den Actin-Myosin-Interaktionen und den verschiedenen Formen der Zellmotilität ist dadurch immer größeres Interesse entgegengebracht worden. Trotz der Entdeckung zahlreicher Regulationsmechanismen für die Actomyosin-Aktivität, ist die Teilnahme des Myosins an der Bewegung bisher nur bei der Muskelkontraktion und bei der Spaltung des Seesterneies (Mabuchi und Okuno, 1977) nachgewiesen.

Bei dem Mikroorganismus Dictyostelium discoideum gibt es Hinweise auf die Teilnahme des Myosins an der chemotaktischen Orientierung der Amöben: Während der Stimulation von Amöben durch zyklisches AMP, das als chemischer Lockstoff auf aggregierende Zellen dieses Organismus wirkt, beobachteten Rahmsdorf et al. (1978) eine Änderung der Phosphorylierung der schweren Ketten des Myosins.

In dieser Arbeit werden Methoden aufgezeigt, mit denen aus aggregationskompetenten Amöben Myosin gereinigt, und eine Myosin-spezifische Kinase-Aktivität (MHC-Kinase II) angereichert werden kann. Mit Hilfe dieser Kinase können maximal $3,6 \text{ mol P}_i/\text{mol Myosin}$ eingebaut werden. Phosphoamino-säureanalysen zeigen, daß ausschließlich Threonin-Reste phosphoryliert werden. Die Kinase phosphoryliert auch Myosin aus Physarum polycephalum-Plasmodien, aber nicht Kaninchen-Skelettmuskel-Myosin. ^{32}P -Phosphopeptidanalysen von chymotryptischen und tryptischen Myosin-Fragmenten von 180 kd, 132 kd, 85 kd, 40 kd und 38 kd enthalten immer beide Phosphorylierungsstellen. Es wird gezeigt, daß eine von der MHC-Kinase II verschiedene Kinase aus vegetativen Amöben das Myosin an denselben Stellen phosphoryliert. Vergleichende

Versuche mit Myosin aus vegetativen Zellen zeigen, daß dieses Myosin mit dem aus aggregationsreifen Amöben identisch ist. Während dieses im voll phosphoryliertem Zustand isoliert wird, ist frisch aufgearbeitetes Myosin aus aggregationskompetenten Amöben nicht phosphoryliert.

Mit diesen Ergebnissen trägt diese Arbeit zu den Kenntnissen über die Biochemie der Regulation der Actomyosin-Aktivität in Dictyostelium-Amöben bei. Diese Kenntnisse können beim Studium von Motilitäts-Mutanten oder von Zellen, bei denen durch Mikroinjektion von Myosin- oder Kinase-Antikörpern Bewegungsmechanismen gestört wurden, verwendet werden.

In der Diskussion werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden über die Myosin-Phosphorylierung in anderen Zellsystemen verglichen.

II. EINLEITUNG

Actin und Myosin - bekannt als die Hauptproteine der Muskelzellen - sind während der letzten Jahre aus einer Vielzahl verschiedener Zellen isoliert und gereinigt worden. Es ist heute unumstritten, daß diese beiden Proteine maßgeblich an der Krafterzeugung innerhalb der Zelle beteiligt sind. Diese beruht auf der Transformation von chemischer Energie in mechanische Arbeit durch die, von Actin stimulierte, Mg^{2+} -ATPase-Aktivität des Myosins.

Aufgrund der Kenntnis über das Kontraktionssystem der Muskelzelle - hier bilden beide Proteine fadenförmige Polymere: die Actin- und Myosin-Filamente - sind drei Arten der Steuerung der Actomyosin-Aktivität denkbar: durch Regulation des Polymerisationsgrades des Actins oder des Myosins, und durch die Regulation des Zusammenwirkens dieser beiden Proteine.

Die Zellen bedienen sich dieser Arten der Steuerung:

- Es sind über 30 verschiedene Proteine bekannt, die auf die Polymerisation des Actins zu Filamenten und deren Quervernetzung einwirken.
- Das in der Muskelzelle vorkommende Tropomyosin lagert sich bei Abwesenheit von Ca^{2+} so an die Actin-Filamente, daß eine Interaktion mit den Myosin-Filamenten sterisch unmöglich wird.
- Myosin wird von spezifischen Kinasen phosphoryliert. Dadurch wird seine Fähigkeit, Filamente zu bilden, und die Aktivierbarkeit seiner Mg^{2+} -ATPase-Aktivität durch Actin beeinflusst.

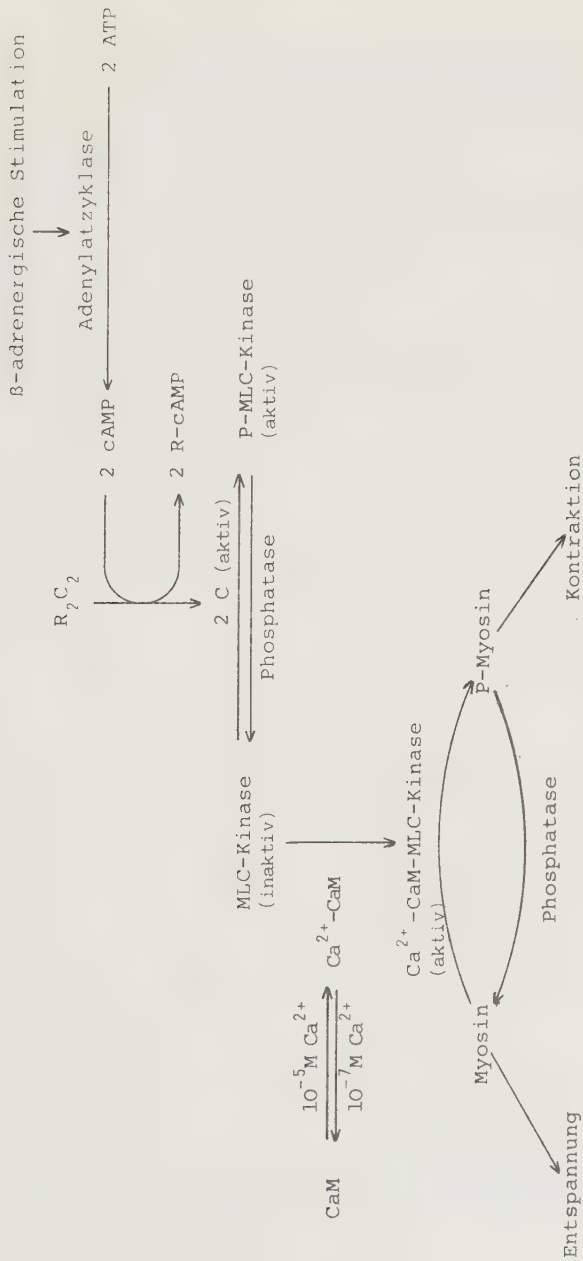
Auf die Phosphorylierung des Myosins soll hier näher eingegangen werden.

Es ist bekannt, daß eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase das Glattmuskelfmyosin spezifisch auf einer seiner leichten Ketten phosphoryliert (Myosin-leichte-Kette-Kinase, MLC-Kinase). Dadurch wird sowohl die Polymerisation zu Filamenten, als auch die Actin-Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität stimuliert. Diese MLC-Kinase kann durch Phosphorylierung mit einer zyklisch-AMP abhängigen Proteinkinase inaktiviert werden (Adelstein und Eisenberg, 1980) (siehe Abbildung 1).

Der gleiche Regulationsmechanismus wurde in einigen Nichtmuskelfzellen, wie Thrombozyten (Adelstein und Conti, 1975; Hathaway und Adelstein, 1979), Makrophagen (Trotter und Adelstein, 1979) und Thymuszellen (Scholey et al., 1980) gefunden. Obwohl nachgewiesen ist, daß auch Skelettmuskelfmyosin von einer MLC-Kinase phosphoryliert wird (Perrie et al., 1972), ist man sich über die Bedeutung dieses Vorganges noch im Unklaren (Morgan et al., 1976).

Auch in Amöben kommt die Myosin-Phosphorylierung vor. So werden in Acanthamoeba castellanii alle drei verschiedenen Isozyme des Myosins auf den schweren Ketten phosphoryliert (Myosin-schwere-Kette-Kinase; MHC-Kinase). Während bei den Myosinen Ia und Ib durch die Phosphorylierung die Actin-Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität erhöht wird (Maruta und Korn, 1977), wird sie beim Myosin II herabgesetzt (Collins und Korn, 1980). Von letzterem ist auch bekannt, daß *in vivo* zwei Phosphatgruppen am Schwanzende der schweren Kette eingebaut werden (Collins et al., 1982).

Obwohl man aufgrund biochemischer, immunologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen weiß, daß Actin an allen Formen der Cytochalasin-sensitiven Zellmotilität, wie Fortbewegung (Zell-Lokomotion), Zellteilung, intrazellu-



(nach: Adelstein und Eisenberg, 1980)

Abbildung 1: Regulationsschema der Kontraktion beim glatten Muskel

läre Transportmechanismen und Muskelkontraktion, teilhat, ist über die Beteiligung des Myosins an der Motilität von Nichtmuskelnzellen wenig bekannt. Außer der auf Myosin-Actin Interaktion beruhenden Muskelkontraktion ist nur bei einem Bewegungsmechanismus die Rolle des Myosins nachgewiesen: die Zellteilung des Seesterneies (Furchung) (Mabuchi und Okuno, 1977).

Myosin scheint aber auch an der amöboiden Zellbewegung beteiligt zu sein: Während der chemotaktischen Stimulation von Dictyostelium discoideum Amöben beobachteten Rahmsdorf et al. (1978) eine Veränderung der Myosin-Phosphorylierung.

Um die Zusammenhänge zwischen Regulationsmechanismen und Zellmotilität zu untersuchen, können im wesentlichen zwei Arbeitsmethoden angewandt werden:

- Der Einsatz von Antikörpern um bestimmte Vorgänge zu blockieren, und
- die biochemische Analyse von Mutanten, die Defekte in ihrer Motilität aufweisen.

Bevor man diese Methoden einsetzen kann, muß die Biochemie des kontraktilen Systems des Wildtyps genügend bekannt sein. Dazu ist es notwendig, seine molekularen Komponenten zu isolieren, ihre Eigenschaften zu studieren und letztlich das physiologische System wieder herzustellen.

Für diese biochemischen Arbeiten eignet sich der zelluläre Schleimpilz Dictyostelium discoideum besonders: Als Mikroorganismus läßt er sich in großen Mengen in Fermenterkulturen in Form suspendierter Einzelzellen züchten. Nach der Vermehrungsphase beginnen diese Zellen in einem Nährstoff-freien Medium durch Aggregation einen vielzelligen Organismus aufzubauen, nachdem sie einen Entwicklungsprozeß zu aggregationsreifen Zellen durchlaufen haben. Die Orientierung der Amöben während der Aggregation beruht auf einer

durch zyklisches AMP ausgelösten chemotaktischen Reaktion. Eine wichtige Eigenschaft von Dictyostelium discoideum ist, daß Mutanten leicht erhältlich sind.

In Abbildung 2 ist der Lebenszyklus von Dictyostelium discoideum dargestellt. Obwohl die Amöben sowohl in der Vermehrungs-, als auch in der Entwicklungsphase chemotaktisch reagieren können, gibt es biochemische Unterschiede zwischen den Amöben der beiden Stadien: Im vegetativen Stadium wirkt Folsäure als Lockstoff zur Nahrungssuche (Pan et al., 1975). Während dieser Zeit reagieren die Zellen nur sehr schwach auf zyklisches AMP. Aggregierende Amöben jedoch reagieren sehr empfindlich auf diese Substanz (10^{-15} Mol). Dabei bewegen sie sich nicht nur auf die zylo-AMP-Quelle zu, sondern beginnen selbst zyklisches AMP abzugeben (Bonner et al., 1972). Dadurch wird die räumliche Verbreitung des Aggregations-Signals gewährleistet. Diese Zellen reagieren nur sehr schwach auf chemotaktische Lockstoffe bakteriellen Ursprungs (wie zum Beispiel die Folsäure).

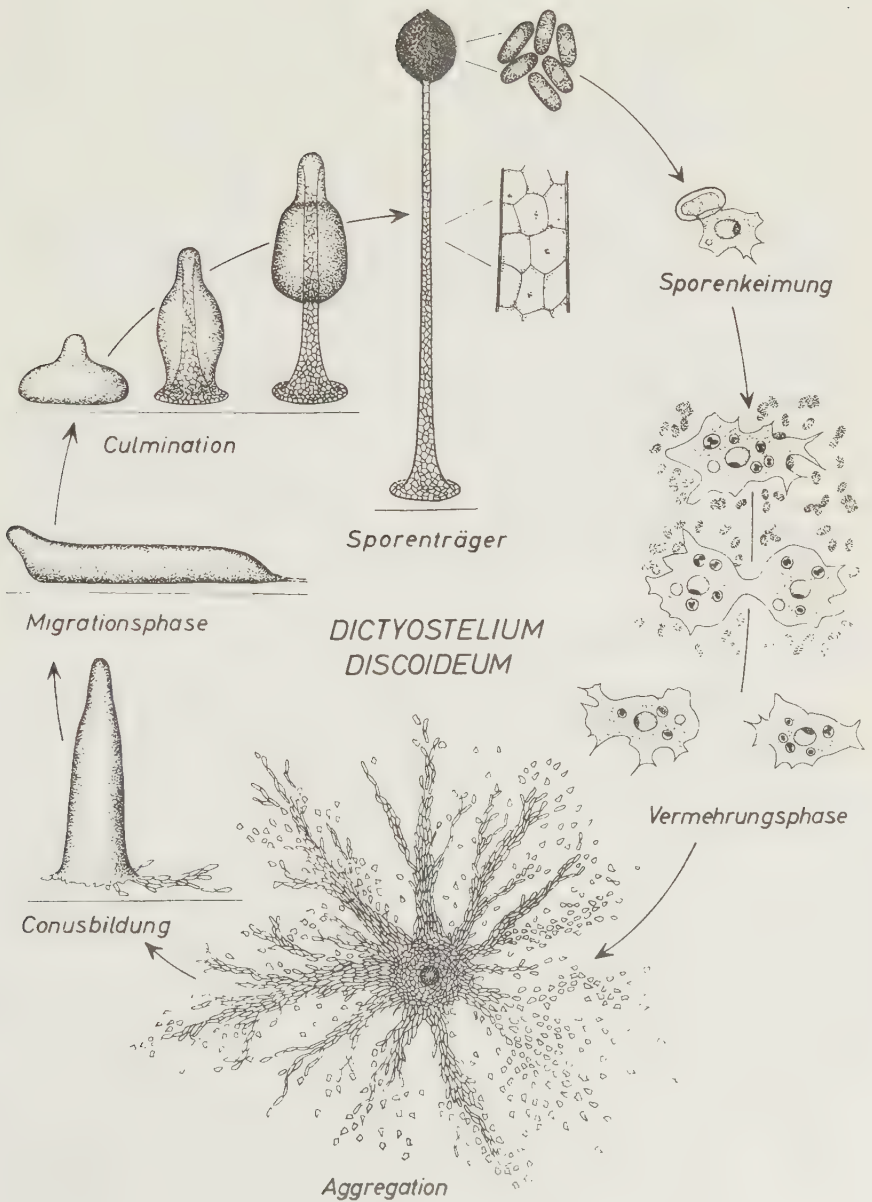
Myosin aus Dictyostelium-Zellen der Vermehrungsphase ist isoliert und gereinigt worden (Clarke und Spudich, 1974). Es wird im Schwanzabschnitt der schweren Kette phosphoryliert (Peltz et al., 1981). Dabei werden die Fähigkeit Filamente zu bilden und die Actin-Aktivierung seiner Mg^{2+} -ATPase inhibiert (Kuczmarski und Spudich, 1980). In vegetativen Amöben wurde eine und in aggregationskompetenten Amöben wurden zwei lösliche Myosin-spezifische Kinase-Aktivitäten nachgewiesen: veg. MHC-Kinase und MHC-Kinasen I und II. Die MHC-Kinase I gleicht in ihrem chromatographischen Verhalten weitgehend der veg. MHC-Kinase. Die MHC-Kinase II unterscheidet sich darin von den beiden anderen Enzymen. Als einzige wird sie von Ca^{2+} /Calmodulin inaktiviert. Sie repräsentiert 70 % bis 80 % der löslichen Kinase-Aktivität und kommt ausschließlich in aggregationskompetenten

Zellen vor (Maruta et al., 1982). Malchow et al. (1981) haben in diesen Zellen außerdem eine membrangebundene Kinase-Aktivität entdeckt, die - im Gegensatz zu den drei löslichen - anscheinend nicht von Actin inhibiert wird.

Da zumindest eine der MHC-Kinasen, die MHC-Kinase II, nur in einem Entwicklungsstadium vorkommt, stellt sich die Frage nach ihrer Substratspezifität. Ziel dieser Arbeit ist es, dieser Frage nachzugehen. Dazu werden Myosine aus den beiden Entwicklungsstadien mit verschiedenen Kinasen phosphoryliert und Phosphopeptid- und Phosphoaminosäureanalysen durchgeführt.

Abbildung 2: Entwicklungszyklus von Dictyostelium discoideum

Die Entwicklung der Zellen beginnt mit der Keimung einer Spore, die eine amöboid bewegliche Zelle freigibt. Die Amöbe phagozytiert Bakterien und vermehrt sich, bis die Nahrungsgrundlage aufgebraucht ist. Während dieser Vermehrungsphase leben die Amöben als voneinander unabhängige Einzeller. Mit dem Nahrungsmangel beginnt die Zelldifferenzierung bei Dictyostelium. Zuerst beginnen einige wenige "Initiatorzellen" die anderen Amöben um sich zu scharen. Dies leitet die Aggregationsphase ein, während der sich die Amöben durch chemotaktische Anlockung durch zyklisch AMP zu den Aggregationszentren hinbewegen. Durch das von zyklisch AMP ausgelöste Auftreten neuer Zelloberflächenmoleküle kommt es dabei zur Bildung von stabilen Zellkontakten. Die Aggregationsphase geht über die Conusbildung in die Migrationsphase über. Die Entwicklung der Amöben endet schließlich in der Aufrichtung der Zellmasse und der Bildung eines Sporenträgers mit der Ausdifferenzierung zweier Haupttypen von Zellen: Sporen und Stielzellen. Jede Spore kann einen neuen Entwicklungszyklus einleiten.



III. MATERIAL und METHODEN

III.1. Material:

DTT, PMSF und alle Enzyme waren von Sigma. Gamma ^{32}P -ATP war von Amersham. Es wurde in wässriger Lösung geliefert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Chemikalien für Pufferlösungen waren "PA"-Qualität und wurden von Merck bezogen. Akrylamid und SDS waren von Serva.

Für Enzyme, die in vielen verschiedenen Qualitäten lieferbar sind, werden im Text genaue Bestellinformationen angegeben.

Die genauen Bezeichnungen der verwendeten Rotortypen sind ebenfalls im Text vermerkt.

III.2. Zellkultur:

Die axenische Linie Ax2-214 von Dictyostelium discoideum wurde auf einem Pepton-Hefeextrakt-Medium (Watts und Ashworth, 1970), welches 18 g Maltose/l enthielt, in drei 10 l Fermentern bei $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert.

Vegetative Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca. 10^7 /ml geerntet. Dafür wurden die Fermenter mit Eis auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren in einer Durchlaufzentrifuge (Padberg, 1000 g) geerntet, und anschließend zweimal in je 3 l 17 mM Soerensen-Phosphatpuffer, pH 6, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewaschen.

Aggregationsreife Zellen wurden gewonnen, indem vegetative Amöben in Soerensen-Phosphatpuffer (bei $23\text{ }^{\circ}\text{C}$) in einer Dichte von 10^7 Zellen/ml suspendiert wurden.

Die Entwicklung dieser Amöben zur Aggregationsreife wurde mit Hilfe von zyklisch-AMP Pulsen (20 nM Endkonzentration,

alle 6' ein Puls) (Gerisch et al., 1975) unterstützt. Diese Zellen wurden nach 6 bis 8 Stunden auf die gleiche Art geerntet und gewaschen wie die vegetativen Amöben.

Von einer 30 l Kultur erhält man ca. 400 g Zellen (Nassgewicht).

III.3. Gewinnung von Myosin aus aggregationsreifen Zellen:

Da die von Clarke und Spudich (1974) beschriebene Methode zur Gewinnung von Myosin aus vegetativen Dictyostelium Zellen bei aggregationsreifen Amöben nicht geeignet erschien, wurde eine neue Methode entwickelt, die die rasche Aufarbeitung großer Zellmengen erlaubt (siehe Abbildung 3).

Aggregationskompetente Zellen (ca. 400 g Nassgewicht) - durch Zentrifugieren einer 30 l Kultur geerntet - wurden in zwei Volumina G-Puffer

30 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM DTT
0,1 mM ATP
1 mM EGTA
0,5 mM PMSF
0,02 % NaN₃

(Gordon et al., 1976) suspendiert und in einer Parr-Bombe (5' bei 450 PSI Stickstoff) homogenisiert.

Zell-Bruchstücke wurden durch Zentrifugieren (10', 10.000 g, Rotor SORVALL GSA, 8.000 Rpm) entfernt. Der Überstand wurde weiter 3 h bei 100.000 g zentrifugiert (Rotor Kontron TFA 45, 35.000 Rpm). Der so erhaltene Überstand wurde zur Aufarbeitung von Myosin-Kinasen und Actin aufgehoben.

Das im Niederschlag enthaltene Myosin wurde in 270 ml KCl-Puffer:

1 M KCl
30 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM DTT
1 mM ATP
0,5 mM PMSF

gelöst (Gesamtvolumen 370 ml), und erneut 3 h bei 100.000 g zentrifugiert. Das Myosin wurde mit 1,5 M Ammoniumsulfat aus dem Überstand präzipitiert und in 30 ml KCl-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 30 ml einer 1,2 M KJ-Lösung und 20' Zentrifugieren bei 100.000 g wurde die Myosin-Lösung durch Gel-Filtration weiter fraktioniert. Dazu wurde eine Bio Gel A15 Säule (5x50 cm) mit BG-Puffer

0,6 M KCl
30 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM DTT
0,1 mM Mg-ATP
0,5 mM PMSF

äquilibriert, um dann nacheinander 40 ml KJ-Puffer (KCl-Puffer mit 0,6 M KJ) und die Myosin-Probe aufzutragen, die mit BG-Puffer eluiert wurde (90 ml/h) (Pollard et al., 1974). Die nach dem Ausschlußvolumen eluierten, Ca^{2+} -ATPase enthaltenden Fraktionen, wurden vereint und 3 h bei 100.000 g zentrifugiert um eine leichte Trübung zu entfernen. Das im Überstand enthaltene Myosin wurde durch 3 M Ammoniumsulfat präzipitiert, in 20 ml TDA-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM DTT
0,02 % NaN_3

mit 6 M KCl gelöst und gegen TDA-Puffer mit 15 % Saccharose

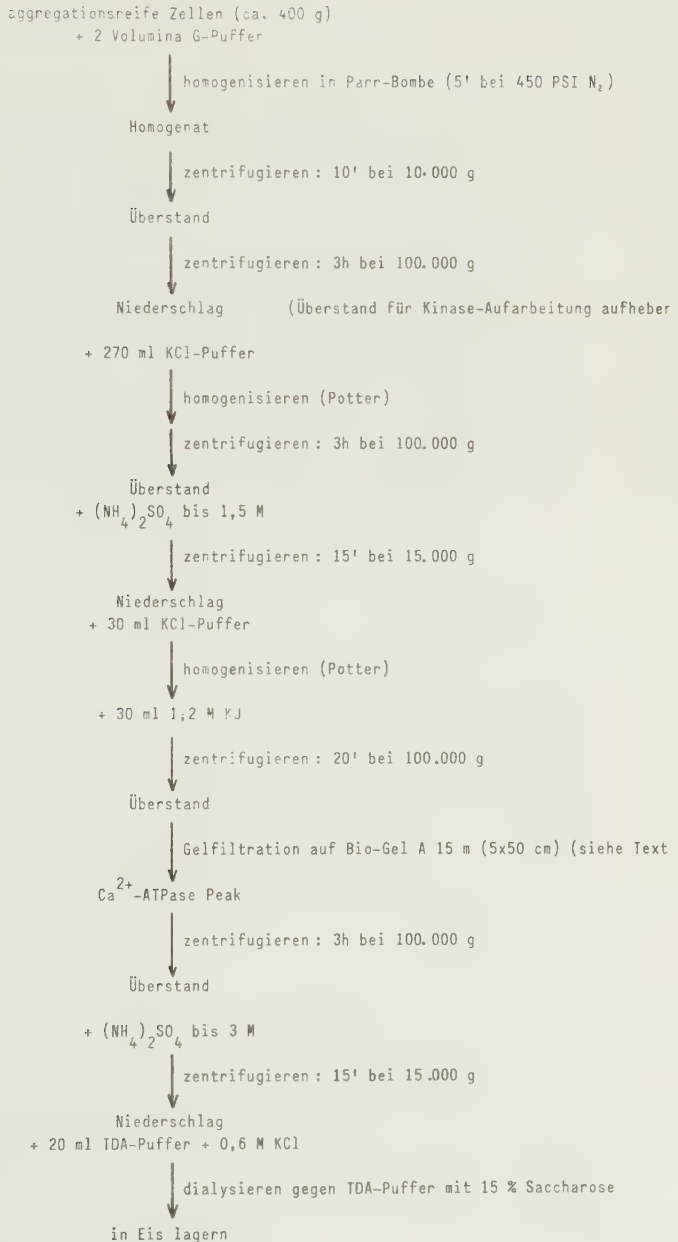


Abbildung 3: Reinigungsschema zur Gewinnung von Myosin aus aggregationsreifen Dictyostelium-Zellen

dialysiert. Auf diese Weise wurden 80 bis 100 mg Myosin aus 400 g Dictyostelium-Zellen erhalten.

III.4. Bestimmung der ATPase-Aktivität:

Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -ATPase-Aktivitäten von Myosin wurden nach der Methode von Pollard und Korn (1973) gemessen. Das Testgemisch bestand aus 0,5 ml Test-Puffer:

für Ca^{2+} -ATPase: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM gamma ^{32}P -ATP
 10 mM CaCl_2
 150 mM KCl

für Mg^{20} -ATPase: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM gamma ^{32}P -ATP
 2 mM MgCl_2

und 10 bis 50 μl Probe und wurde 10' bis 1 h bei 35 °C inkubiert. Das freigewordene radioaktive anorganische Phosphat wurde mit Hilfe eines Benzol-Butanol Gemisches (1:1, Vol/Vol, 1 ml) als Phosphomolybdat extrahiert und durch Szintillationszählung quantifiziert (Martin und Doty, 1949).

III.5. Nachweis und Bestimmung der Kinase-Aktivitäten:

Zum Nachweis der Myosin-Kinase-Aktivitäten wurden 20 μg Myosin mit einer Kinase-Fraktion und gamma ^{32}P -ATP 30' bei 35 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch hatte ein Volumen von 100 μl und enthielt:

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
5 mM MgCl₂
0,2 mM gamma ³²P-ATP
1 mM DTT

Die schwere Kette des Myosins wurde elektrophoretisch auf einem 6 oder 10 %igen SDS-Polyakrylamid-Gel nach Laemmli (1970) von anderen Peptiden getrennt. Das gebundene ³²P wurde qualitativ und semi-quantitativ durch Autoradiographie (Kodak NS-2T Röntgenfilm) nachgewiesen. War eine genaue quantitative Bestimmung nötig, so wurde diese mit der Filterpapier-Methode durchgeführt, wie sie Maruta und Korn (1981) beschrieben haben.

III.6. Vorreinigung der MHC-Kinase II:

Das Ausgangsmaterial für die Reinigung einer MHC-Kinase war der bei der Myosin-Reinigung angefallene 100.000 g Überstand. Das gesamte Volumen von etwa 800 ml wurde auf eine mit TDA-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM DTT
0,02 % NaN₃

äquilibrierte DEAE-Zellulose-Säule (Whatman DE 52, 2,6x40 cm) aufgetragen, die dann mit dem gleichen Puffer gespült wurde. Die Kinase-Aktivität war im Durchfluß enthalten. Sie wurde bei der anschließenden Ammoniumsulfat-Fraktionierung zwischen 1,5 und 2,0 M ausgefällt, in 30 ml TDAS-Puffer (TDA-Puffer mit 15 % Saccharose) aufgenommen und gegen diesen Puffer dialysiert.

Die Probe wurde auf eine mit TDA-Puffer äquilibrierte

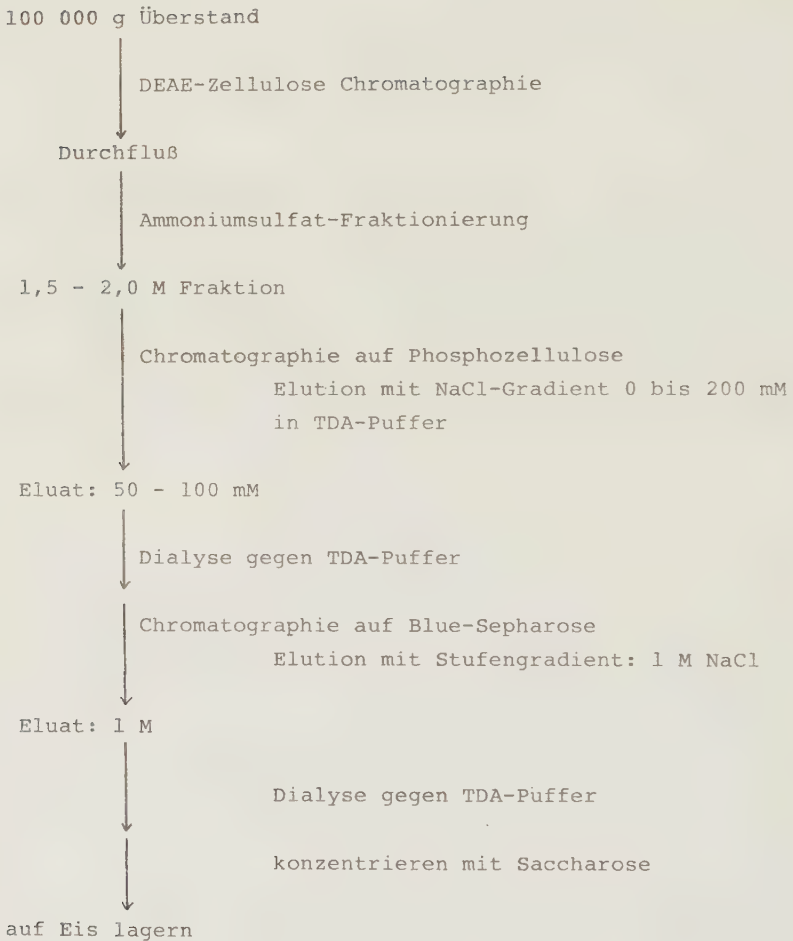


Abbildung 4: Reinigungsschema für die MHC-Kinase II aus aggregationsreifen Dictyostelium-Zellen

Phosphozellulose-Säule (Whatman P 11, 1,5x10 cm) aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten (in TDA-Puffer, 0 bis 200 mM) eluiert. Die Kinase eluierte zwischen 50 und 100 mM NaCl. Sie wurde gegen TDA-Puffer dialysiert, auf eine Blue-Sepharose-Säule (Pharmacia, 10 ml, mit TDA-Puffer äquilibriert) aufgetragen, mit TDA-Puffer mit 1 M NaCl eluiert und nochmals gegen TDA-Puffer dialysiert. Nach 12 h Dialyse wurde der Dialyseschlauch in eine kleine Glaswanne gelegt und mit Saccharose überschüttet. In 10 h wurde das Volumen der Kinase-Lösung so auf 20 % reduziert.

Die auf diese Weise erhaltene Proteinlösung (4 mg Protein in 2 ml) wird im folgenden als "vorgereinigte" MHC-Kinase bezeichnet.

III.7. Phosphatbestimmung:

Um festzustellen, ob das aus aggregationsreifen Dictyostelium-Zellen isolierte Myosin in phosphorylierter oder nicht-phosphorylierter Form vorliegt, wurde eine Phosphatbestimmung durchgeführt. Die dazu notwendige empfindliche Methode (0,02 nmol Phosphat) wurde von Stull und Buss (1977) übernommen.

Die Proteinprobe wurde mit Trichloressigsäure (20%) gefällt, zweimal mit Trichloressigsäure (5 %) gewaschen, in 25 µl Magnesiumnitrat (10 %ige Lösung in 95 %igem Äthanol) gelöst, getrocknet und anschließend verascht. Das dabei entstandene anorganische Phosphat wurde in 150 µl 1,2 N HCl aufgenommen und 50 µl des Phosphat-Reagenz (2,5 % Ammoniummolybdat in 1 N HCl mit 0,15 % Malachit-Grün) hinzugegeben. Das gebildete Phosphomolybdat bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Malachit-Grüns, was sich durch eine Farbänderung von braun zu grün bemerkbar macht. Diese Verschiebung wird photometrisch bei 660 nm gemessen.

Es wurden 240 µg Myosin eingesetzt, was 0,96 nmol an schwerer Kette entspricht. Als Standard wurden Proben mit 0; 0,5; 1,0 und 1,5 nmol Phosphat und 240 µg Rinder Serumalbumin eingesetzt.

III.8. Phosphoaminosäurebestimmung:

Die die Phosphatgruppe tragende Aminosäure in den schweren Ketten des Myosins wurde nach der Methode von Hunter und Sefton (1980) bestimmt.

Myosin (20 µg) wurde - wie schon im Abschnitt "Nachweis und Bestimmung der Kinase-Aktivitäten" beschrieben - phosphoryliert. War Myosin das einzige phosphorylierte Protein, so wurde das Inkubationsgemisch gegen 1 M Ammoniumformiat-Puffer (pH 6,5) dialysiert, anschließend gefriergetrocknet und in 0,5 ml 6 N HCl unter Vakuum bei 120 °C, 2 h lang, hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter Vakuum getrocknet, in 20 µl Elektrophorese-Puffer pH 1,9 (Essigsäure/Ameisensäure/Wasser, 52:21:750, Vol/Vol) aufgenommen, zusammen mit Phosphoaminosäurestandards (je 5 µg P-Threonin, P-Serin und P-Tyrosin) auf eine Zellulose-Dünnschicht-Platte (Macherey und Nagel, Polygram Cel 400, 20x20 cm) aufgetragen und in zwei Dimensionen elektrophoretisch getrennt:

1. Dimension: 2 h bei 750 V mit Puffer pH 1,9 (wie oben)
2. Dimension: 1,5 h bei 500 V mit Puffer pH 3,7 (Essigsäure/Pyridin/Wasser, 10:1:89, Vol/Vol).

Die Zellulose-Platte wurde mit Ninhydrin angefärbt um die Positionen der drei Standards zu bestimmen. Anschließende Autoradiographie (Kodak NS-2T Röntgenfilm) gab Auskunft über die Position - und dadurch auch über die Natur - der unbe-

kannten, mit ^{32}P markierten, Phosphoaminosäure.

War Myosin nicht das einzige phosphorylierte Protein, so wurde zuerst - wie im nächsten Abschnitt beschrieben - die schwere Kette von den anderen Peptiden getrennt, um dann - wie hier gezeigt - weiterbehandelt zu werden.

III.9. Phosphopeptidanalyse:

Die Phosphopeptidanalyse wurde nach der Methode von Gracy (1977) durchgeführt, wobei es - wegen des lipophilen Charakters der Myosin-Peptide - nötig war, ein neues Puffersystem anzuwenden.

20 μg Myosin wurden - wie schon beschrieben - mit gamma- ^{32}P -ATP phosphoryliert und die schwere Kette durch SDS-Gelelektrophorese auf einem 6 %igen Polyakrylamid-Gel von anderen Peptiden getrennt. Die Bande mit der schweren Kette wurde aus dem angefärbten und getrockneten Gel herausgeschnitten, in 0,5 ml 0,1 M Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 8) mit 50 μg Chymotrypsin (Sigma, Typ VII TLCK-behandelt) oder Trypsin (Sigma, Typ XI DPCC-behandelt) oder einem Gemisch von je 25 μg Chymotrypsin (Sigma, Typ II) und Trypsin (Sigma, Typ I) 12 h bei 35 °C inkubiert. Um eine möglichst vollständige Verdauung zu erreichen, wurde nach 12 h und nach 24 h zusätzlich die gleiche Menge an Protease(n) hinzugegeben und jeweils 12 h inkubiert (Gesamtinkubationszeit 36 h).

Das so erhaltene Peptidgemisch wurde gefriergetrocknet, in 20 μl Elektrophorese-Puffer pH 3,7 (Essigsäure/Pyridin/Wasser, 10:1:89, Vol/Vol) aufgenommen und davon 5 μl auf eine Zellulose-Platte (Macherey und Nagel, Polygram Cel 400, 20x20 cm) aufgetragen. In horizontaler Richtung wurden die Peptide elektrophoretisch getrennt (0,4 kV, 1,5 h), in vertikaler Richtung durch Chromatographie (Essigsäure/Pyridin/Wasser/n-Butanol, 10:33:40:50, Vol/Vol). Die Positionen der Peptide wurden durch Autoradiographie festgestellt.

III.10. Begrenzte Chymotrypsin-Spaltung von Myosin:

Die für manche Versuche verwendeten Myosin-Fragmente von 38 kd und 132 kd wurden durch begrenzte Chymotrypsin-Spaltung gewonnen. Dazu wurden 8 mg Myosin zusammen mit 100 µg Chymotrypsin (Sigma, Typ VII TLCK-behandelt) in 2 ml Puffer

40 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM DTT
1 mM EGTA
0,6 M NaCl
0,02 % NaN₃

10' bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (0,7 mM Endkonzentration) gestoppt. Die so erhaltenen Fragmente konnten durch SDS-Gelelektrophorese getrennt werden.

Die Ausbeute an den beiden Fragmenten war nicht davon abhängig, ob das eingesetzte Myosin in nativer oder in denaturierter Form vorlag.

III.11. Herstellung von Myosin-Sepharose zur Affinitätschromatographie:

Die Herstellung von Myosin-Sepharose zur Affinitätschromatographie wurde nach der Methode von March et al. (1974) durchgeführt.

Zu 60 g Sepharose 4B (Pharmacia) in 100 ml Wasser wurden tropfenweise 6 ml einer Zyanogenbromid-Lösung (1,3 g CNBr/ml Azetonitril) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde 5' bei Raumtemperatur gerührt. (Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4 °C ausgeführt.)

Die so aktivierte Sepharose wurde anschließend zuerst mit 1 l kaltem Wasser (in kleinen Portionen), dann mit 1 l kaltem 0,2 M Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5) in einer Glasnutsche gewaschen. Abschließend wurde sie in 60 ml des gleichen Puffers suspendiert.

Zu 20 ml dieser Suspension wurden - ebenfalls tropfenweise - 15 ml einer Myosin-Lösung (3,3 mg Myosin/ml im gleichen Puffer, allerdings mit 0,5 M KCl) zugegeben und dieses Gemisch 12 h gerührt. Das Sepharose-Gel wurde mit 0,5 l Wasser gewaschen und 3 h lang mit 20 ml Äthanolamin-Lösung (2 M, pH 8) inkubiert, um noch freie Kopplungsstellen auf der Sepharose zu blockieren.

Die fertige Myosin-Sepharose wurde in eine Säule gegossen, mit TDA-Puffer mit 0,5 M KCl gewaschen und mit TDA-Puffer äquilibriert.

III.12. Herstellung eines F-Actin Affinitätsmaterials:

8 mg Muskel-Actin wurden in Gegenwart von 0,15 mg Phalloidin (Boehringer) in 8 ml Lösung:

0,1 M Tris-HCl pH 7,
0,1 mM MgCl₂,
0,1 mM ATP
0,1 mM EGTA

polymerisiert. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 20 h gegen Natriumbicarbonat-Puffer (0,1 M, pH 8) dialysiert und anschließend mit einem Branson Sonifier beschallt (Mikrotip, 30" auf Stellung 3,5).

Zu dem so zubereiteten Actin wurden so schnell wie möglich 2 ml Affi-Gel 10 (Bio-Rad) hinzugegeben. Die Kopplung wurde 4 h bei 4 °C durchgeführt. Noch freie Kopplungsstellen

auf dem Affi-Gel wurden durch Hinzugabe von 0,3 ml 1 M Äthanolamin-HCl (pH 8) blockiert (1 h bei 4 °C). Das F-Actin-Affinitätsmaterial wurde abschließend mit mehreren Volumina 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer gewaschen und mit TDA-Puffer mit 2,5 mM MgCl₂ und 0,2 mM CaCl₂ äquilibriert.

III.13. Proteinbestimmung:

Im allgemeinen wurde der Proteingehalt von Lösungen nach der Methode von Lowry (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Für die Messung der Stöchiometrie der Myosin-Phosphorylierung wurde eine genauere Methode benötigt. Deshalb wurde eine quantitative Aminosäureanalyse von Dictyostelium Myosin durchgeführt. Da befürchtet wurde, daß das Myosin - wegen seines lipophilen Charakters - nicht vollständig durch HCl hydrolysiert werden könne, wurde die Hydrolyse mit einem Trifluoressigsäure/HCl-Gemisch eingesetzt (Tsugita und Scheffler, 1982). Zum Vergleich wurde auch eine "klassische" Hydrolyse mit 6 N HCl unter Vakuum durchgeführt (Edman und Henschen, 1975).

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Reinigung von Myosin:

Da nur aggregationskompetente Zellen von Dictyostelium discoideum chemotaktisch auf zyklisch-AMP reagieren (Bonner et al., 1972), schien es sinnvoll, Amöben dieses Entwicklungsstadiums zum Studium der Myosin-Phosphorylierung zu benutzen.

Von Clarke und Spudich wurde bereits 1974 eine Methode zur Reinigung von Myosin aus vegetativen Amöben publiziert. Sie beruht darauf, daß das Myosin zuerst in Form von Actomyosin extrahiert und dann präzipitiert wird. Anschließend werden Actin und Myosin durch eine KJ-Behandlung (0,6 M) und durch Gelchromatographie voneinander getrennt.

Bei der Reinigung von Myosin aus aggregationsreifen Amöben erwies sich diese Methode als nicht anwendbar: Das erhaltene Myosin zeigte eine sehr geringe spezifische Ca^{2+} -ATPase-Aktivität von 0,002 $\mu\text{mol P}_i/\text{mg Protein/min}$ (gegenüber 0,7 $\mu\text{mol P}_i/\text{mg Protein/min}$ bei Clarke und Spudich, 1974). Ferner war die Ausbeute außerordentlich gering, was auf die im Zellhomogenat enthaltenen Proteasen, von denen nur ein Teil durch PMSF, Pepstatin oder Leupeptin inhibierbar ist (North und Harwood, 1978), zurückgeführt werden kann.

Da bekannt war, daß das Myosin - zumindest teilweise - an das mit der Zellmembran verbundene Actin gebunden ist, wurde versucht, die Membran durch ein Zweiphasen-System (Brunette und Till, 1971) zu reinigen, und dann das Myosin mit Hilfe von ATP davon zu trennen. Auch hier war die Ausbeute äußerst gering. Außerdem wurde die ATPase-Aktivität des Myosins durch die Polyäthylenglykol-Behandlung während der Reinigung der Membran völlig zerstört. Dieser Effekt konnte an intaktem Myosin nachvollzogen werden. Die folgende Tabelle zeigt, daß bereits geringe Konzentrationen von Polyäthylen-

glykol die Myosin-ATPase zerstören können:

Ca²⁺-ATPase-Aktivität nach 5' Vorinkubation mit Polyäthylen-glykol (PEG):

0 % PEG	100 % Aktivität
0,1 %	60 %
0,5 %	25 %
1,0 %	6 %

Es wurde eine neue Methode zur Reinigung des Myosins entwickelt. Sie beruht darauf, die Bildung von Actomyosin so weit wie möglich zu unterbinden, indem bereits beim Homogenisieren der Amöben ATP (0,1 mM) zum Puffer hinzu- gegeben wird. Ferner werden Bedingungen gewählt, die die Polymerisation des Actins verhindern (G-Puffer: stabilisiert das monomere G-Actin). Außerdem werden Dialyseschritte ver- mieden, während der das Myosin durch Proteasen vernichtet wurde. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß gleich nach der ersten 100.000 g Zentrifugation das Volumen der Myosin-Lösung stark verringert wird (1,5 l auf 370 ml), was zu einer weiteren Stabilisierung des Proteins führt. Die Auf- arbeitung des Myosins dauert so von der Extraktion bis zur abschließenden Ammoniumsulfat-Fällung gerade 24 Stunden.

Aus 400 g Amöben erhält man so 80 bis 100 mg reines Myosin mit einer spezifischen Ca²⁺-ATPase-Aktivität von 1,9 µmol P_i/mg Protein/min. Es besteht aus je zwei Polypeptid- ketten mit apparenten Molekulargewichten von 215 kd, 18,5 kd und 16,5 kd (siehe Abbildung 5).

Mit Hilfe der sehr empfindlichen Methode von Stull und Buss (1977) wurde festgestellt, daß dieses Myosin weniger als 0,01 mol Phosphat pro mol schwere Kette enthält. Da das unter ähnlichen Bedingungen isolierte Myosin aus vegetativen Amöben voll phosphoryliert ist (Maruta et al., 1983), ist nicht anzunehmen, daß der geringe Phosphatgehalt von Myosin

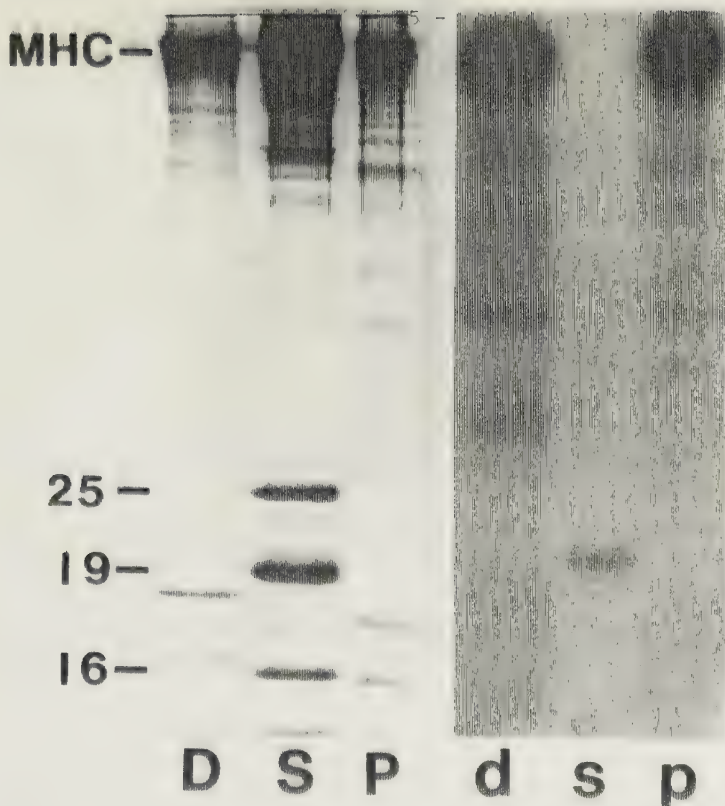


Abbildung 5: Phosphorylierung und SDS-Polyakrylamid Gel=elektrophorese von drei verschiedenen Myosinen

Myosin von Dictyostelium (D und d), Kaninchen Skelettmuskel (S und s) und Physarum (P und p) wurden wie im Abschnitt II.5 beschrieben, mit MHC-Kinase II phosphoryliert und die schweren Ketten von den leichten durch SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese getrennt. D, S und P zeigen die mit Coomassie-Blau angefärbten Gele, und d, s und p die dazugehörenden Autoradiogramme. Die Amöben-Myosine (D und P) werden auf den schweren Ketten phosphoryliert (d und p), das Muskel-Myosin (S) nicht (s). Die Phosphorylierung der 19 kD Kette des Muskel-Myosin stammt von einer MLC-Kinase Kontamination der Myosin-Probe (Kontrolle nicht gezeigt). Dieses Myosin besteht aus einem Gemisch von zwei Isozymen, was die Gegenwart von drei verschiedenen leichten Ketten erklärt (S: 16 kD, 19 kD und 25 kD).

aus aggregationsreifen Amöben durch Phosphatase-Aktivitäten im Zellhomogenat bedingt ist. Die Gegenwart von ATP und die kurze Aufarbeitungszeit sprechen auch dagegen. Daraus kann geschlossen werden, daß in aggregationsreifen Zellen das Myosin in nicht phosphorylierter - also in physiologisch aktiver - Form vorliegt (Kuczmarski und Spudich, 1980; Maruta et al., 1983).

IV.2. Aminosäurezusammensetzung von Dictyostelium-Myosin:

Um die Aminosäurezusammensetzung von Dictyostelium-Myosin zu bestimmen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

- die Hydrolyse des Proteins mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure und HCl nach Tsugita und Scheffler (1982), und
- die Hydrolyse mit 6 N HCl unter Vakuum (Edman und Henschen, 1975).

Dabei wurde für alle Analysen dasselbe Myosin eingesetzt. Die quantitative Bestimmung mit Hilfe der ersten Methode gibt für 25' und 50' Hydrolysezeit fast identische Ergebnisse. Bei der zweiten Methode beträgt die festgestellte Menge nur 89 % (bei einer Hydrolysezeit von 24 h) oder 85 % (48 h Hydrolyse).

Die folgende Tabelle gibt die relative Aminosäurezusammensetzung bezogen auf 100.000 g Masse an, wie sie durch obengenannte Methoden erhalten wurde. Dabei sind keine qualitativen Unterschiede erkennbar.

Die darauf folgende Tabelle zeigt die Aminosäurezusammensetzung von Dictyostelium-Myosin von verschiedenen Aufarbeitungen im Vergleich mit der von Acanthamoeba-Myosin Ia (Pollard und Korn, 1973), Kaninchen Skelettmuskel-Myosin (Lowey et al., 1969) und Rinderserumalbumin (Dayhoff, 1976).

Aminosäurezusammensetzung von Dictyostelium-Myosin:

Vergleich der Methoden nach Tsugita und Scheffler (1982) und nach Edman und Henschen (1975). Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren in mol pro 100.000 g Proteinmasse an.

Methode:	TFA/HCl		6 N HCl	
	166 °C		110 °C	
Zeit:	25'	50'	24 h	48 h

Aminosäure:

Asp	109,2	111,9	110,0	102,3
Thr	44,8	45,4	48,6	49,2
Ser	53,1	54,1	65,8	60,7
Glu	160,9	152,4	158,9	171,0
Pro	---	---	---	---
Gly	39,4	39,9	39,5	39,9
Ala	73,0	71,3	74,3	74,7
Cys	---	---	---	---
Val	42,8	38,7	26,7	31,6
Met	13,6	12,5	16,0	14,2
Ile	33,7	39,1	30,1	33,5
Leu	88,1	84,4	86,7	85,4
Tyr	17,9	15,5	20,3	19,8
Phe	31,5	32,1	31,4	31,3
Lys	111,8	118,3	105,0	108,2
His	11,6	11,4	10,7	10,8
Arg	44,1	47,9	50,7	43,5

Prolin, Cystein und Tryptophan wurden nicht bestimmt.

Vergleich der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Myosine und Rinderserumalbumins:

Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren in mol pro 100.000 g Proteinmasse an.

Methode: 6 N HCl, 24 h bei 110 °C unter Vakuum

Probe:	Dictyostelium	A.C.	Muskel-	BSA
	A	B	Myosin Ia	Myosin

Aminosäure:

Asp	101,2	120,4	108	85	94
Thr	45,5	51,6	38	44	42
Ser	62,8	68,8	50	39	41
Glu	157,6	133,2	114	154	113
Pro	22,0	26,4	58	22	42
Gly	36,0	45,2	102	36	25
Ala	72,4	54,8	70	78	70
Cys	6,8	---	---	8,8	41
Val	38,4	42,8	46	43	51
Met	12,8	13,2	30	23	6
Ile	37,6	46,4	44	42	20
Leu	87,2	82,4	75	81	94
Tyr	19,6	24,4	34	20	28
Phe	29,6	33,6	44	29	35
Lys	92,8	84,0	58	92	87
His	10,8	16,4	13	16	26
Arg	48,0	40,4	36	43	33

Dictyostelium- und Skelettmuskel-Myosin sind sich bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der Methionin - und Serin-Reste wesentlich. Große Unterschiede bestehen zum Myosin Ia aus Acanthamoeba. Dieses Myosin ist ein sogenanntes "einköpfiges" Myosin: die schwere und die leichten Ketten sind jeweils nur einmal vorhanden. Außerdem ist die schwere Kette nur sehr kurz: 130 kd gegenüber 200 bis 220 kd bei anderen schweren Ketten.

Diese Analyse zeigt außerdem, daß Rinderserumalbumin, das bei der Proteinbestimmung allgemein als Standard eingesetzt wird, große Unterschiede zu allen Myosinen aufweist. Aus diesem Grunde wurde die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Stöchiometrie der Phosphorylierung des Myosins nicht auf eine relative Proteinbestimmung (wie die Methode von Lowry), sondern auf eine quantitative Aminosäureanalyse bezogen.

IV.3. Partielle Reinigung der MHC-Kinase II:

In aggregationskompetenten Dictyostelium Zellen wurden bisher drei verschiedene MHC-Kinase-Aktivitäten nachgewiesen: Eine membrangebundene (Malchow et al., 1981), und zwei lösliche: MHC-Kinasen I und II (Maruta et al., 1982). Die Kinase II repräsentiert 70 % bis 80 % der löslichen MHC-Kinase-Aktivität.

MHC-Kinase II wurde in der in "Material und Methoden" beschriebenen Weise angereichert: Bei der ersten Stufe - der Chromatographie auf DEAE-Zellulose - wird die Kinase von Actin getrennt, das seine Aktivität hemmt (Maruta et al., 1982). Dadurch wird diese Kinase-Aktivität erst nachweisbar. Da die Kinase nicht an die DEAE-Zellulose bindet, wurde versucht, sie an Phosphozellulose zu

adsorbieren. Im Gegensatz zu den meisten Proteinen, die im Durchfluß eluiert werden, wird die Kinase gebunden (siehe Abbildung 6). Sie eluiert zwischen 50 mM und 100 mM NaCl (in TDA-Puffer). Als nächste Reinigungsstufe wurde die Affinitätschromatographie auf Blue-Sepharose gewählt. Dieses Material besteht aus an Sepharose CL-6B gebundenen Molekülen des Farbstoffs Cibacron Blue F3G-A. Aufgrund der Ähnlichkeit seiner Struktur mit der von Nukleotiden, wird dieser Farbstoff von zahlreichen Proteinen, die Nukleotide als Substrat oder Coenzym erkennen, gebunden. Wie erwartet bindet die MHC-Kinase II an die Blue-Sepharose, von wo sie mit 1 M NaCl (in TDA-Puffer) eluiert werden kann.

Abbildung 7 zeigt die Reinheit der Kinase nach den verschiedenen Aufarbeitungsschritten. Selbst nach der letzten Stufe liegt nicht ein reines Protein, sondern ein Proteingemisch vor, welches bei Inkubation mit Myosin und ATP, ausschließlich die schwere Kette des Myosins phosphoryliert.

Die bessere Reinigung der Kinase - zum Beispiel durch Hydroxylapatit - führte sehr schnell zum Verlust der Aktivität und wurde daher auch nicht weiter untersucht. Für die hier beschriebenen Experimente ist es auch nicht nötig, eine reine Kinase zu benützen. So wäre es auch möglich die Menge des in Proteine der Kinase-Fraktion inkorporierten ^{32}P durch eine Vorinkubation mit nicht markiertem ATP zu reduzieren, wie es von Côté et al. (1981) durchgeführt wurde. Natürlich darf diese Fraktion nicht mehrere Myosin-Kinasen enthalten, da sonst die Untersuchung über deren Spezifität unmöglich wäre. Die hier beschriebene MHC-Kinase II Fraktion besitzt jedoch nur eine MHC-Kinase-Aktivität: Die MHC-Kinase I wird bereits bei der Ammoniumsulfat-Fraktionierung abgetrennt. Falls dennoch Reste davon in der MHC-Kinase II Fraktion enthalten sein sollten, würden sie beim nächsten Reinigungsschritt vollständig beseitigt werden: die MHC-Kinase I wird erst bei 1 M NaCl von der Phospho-Zellulose eluiert,

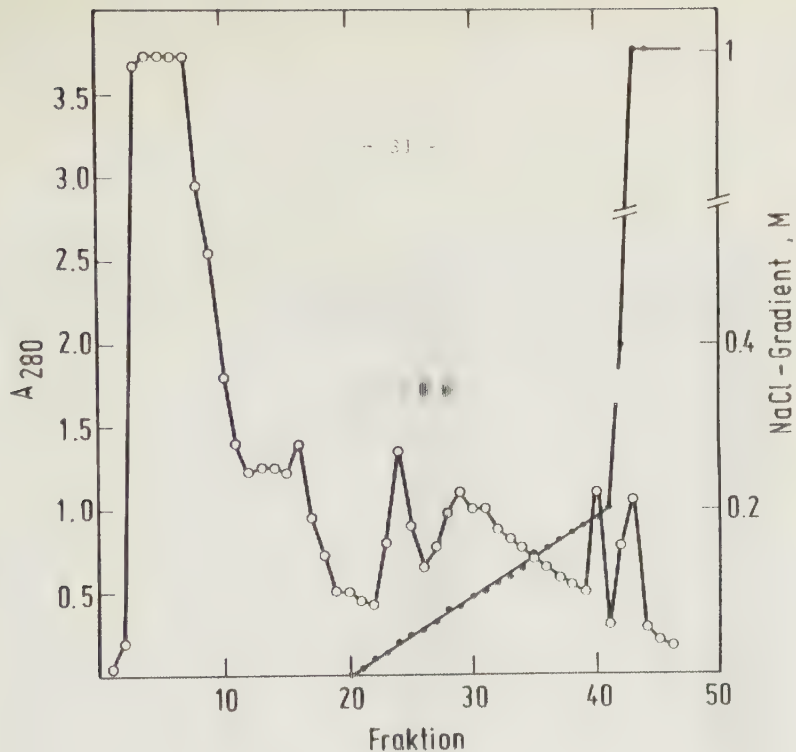


Abbildung 6: Chromatographie der MHC-Kinase II auf Phosphozellulose

MHC-Kinase II wurde wie in Abschnitt II.6 beschrieben auf Phosphozellulose adsorbiert und mit einem NaCl-Gradienten (0 bis 200 mM) eluiert:

- offene Kreise: optische Dichte der Fraktionen (280 nm)
- volle Kreise: Salzgehalt der Fraktionen.

Die MHC-Kinase-Aktivität der Fraktionen 22 bis 42 (jede zweite Fraktion) wurde folgendermaßen bestimmt:

Myosin wurde, wie im Abschnitt II.5 beschrieben, phosphoryliert und die schwere Kette durch SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese von anderen Peptiden getrennt. Anschließende Autoradiographie ergab einen qualitativen Nachweis der Kinase-Aktivität. Der Einsatz im Chromatogramm zeigt den Ausschnitt des Autoradiogramms mit der schweren Kette. Die gesamte Kinase Aktivität ist in den Fraktionen 26 bis 28 enthalten.

Das Fehlen jeglicher Aktivität in der Fraktion 42 zeigt, daß die MHC-Kinase I bei der vorausgegangenen Ammoniumsulfatfraktionierung vollständig abgetrennt worden ist.

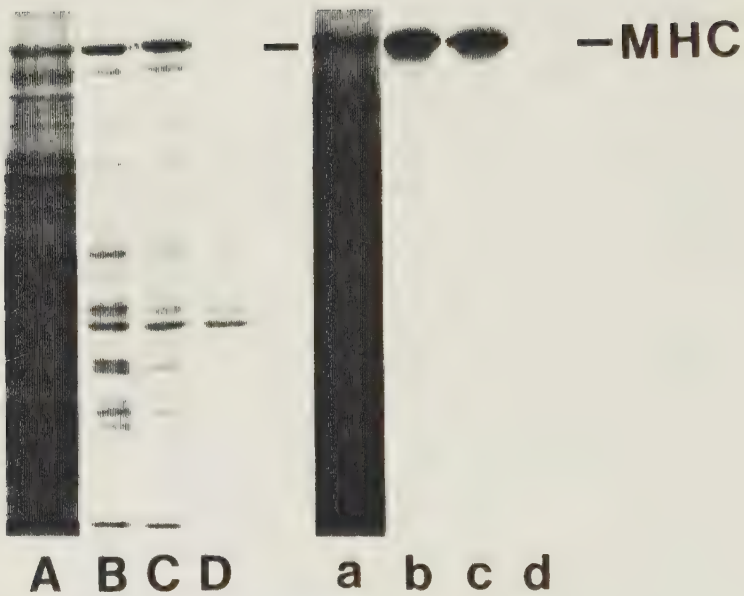


Abbildung 7: SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese verschiedener MHC-Kinase Fraktionen

Myosin wurde mit verschiedenen MHC-Kinase II Fraktionen phosphoryliert (wie in Abschnitt II.5 beschrieben). Das Inkubationsgemisch wurde durch SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und der Einbau von ^{32}P durch Autoradiographie sichtbar gemacht. A, B, C und D zeigen die mit Coomassie-Blau angefärbten Gele und a, b, c und d die Autoradiogramme:

A, a: Ammoniumsulfatfraktion 1,5 bis 2 M,

B, b: Phosphozellulose Eluat,

C, c: Blue-Sephrose Eluat,

D, d: wie C, c, nur ohne Myosin inkubiert.

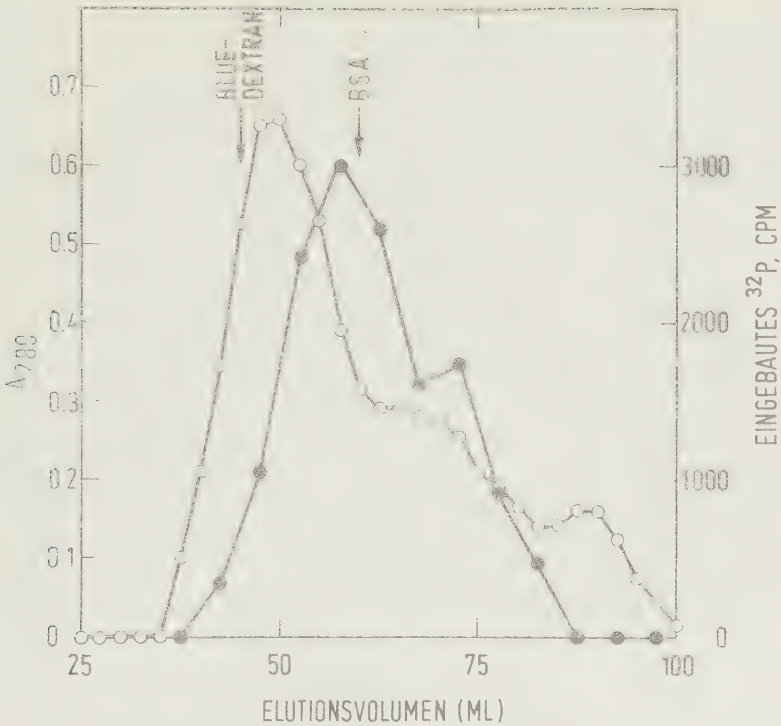


Abbildung 8: Molekulargewichtsbestimmung der MHC-Kinase II

Eine MHC-Kinase II Fraktion wurde auf Sephadex G 150 chromatographiert:

- offene Kreise: optische Dichte der Fraktionen (280 nm)
- volle Kreise: Kinase Aktivität der Fraktionen

Zur Kalibrierung der Säule wurden Blue-Dextran (über 2×10^6 d) und Rinderserumalbumin (BSA) chromatographiert. Die Pfeile geben die Positionen der entsprechenden Peakfraktionen an.

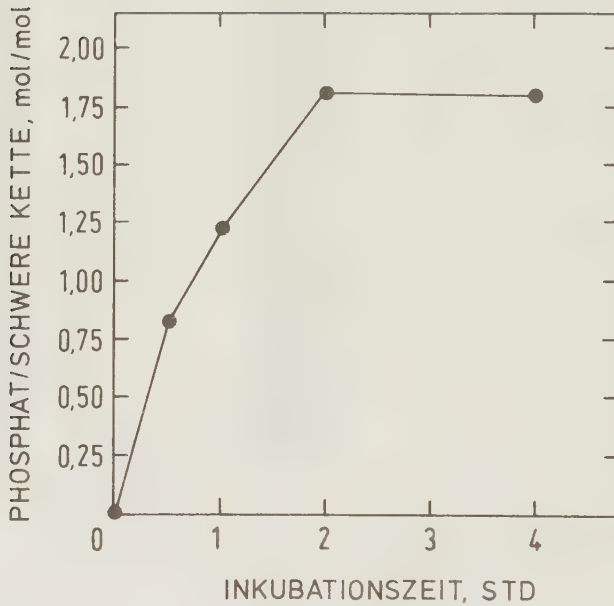


Abbildung 9: Stöchiometrie der Myosin-Phosphorylierung

Myosin wurde mit der vorgereinigten MHC-Kinase II phosphoryliert (wie in Abschnitt II.5 beschrieben) und der Einbau von ^{32}P mit Hilfe der Filterpapier-Methode gemessen. Die Menge an ^{32}P wurde auf die durch quantitative Aminosäurebestimmung festgestellte Menge an Myosin bezogen. Sie wird hier in mol P_i /mol schwere Kette angegeben.

die MHC-Kinase II schon bei 50 bis 100 mM.

Aus 400 g Dictyostelium Zellen wurden im allgemeinen 4 mg Protein einer "vorgereinigten" MHC-Kinase II Fraktion erhalten. Das Molekulargewicht der Kinase wurde durch Gelchromatographie auf Sephadex G150 (Pharmacia) bestimmt, wobei ein Wert von 70 kD erhalten wurde (siehe Abbildung 8).

Es wurde auch versucht, die Kinase durch Affinitätschromatographie auf Myosin- und auf Actin-Sepharose zu reinigen: Myosin deshalb, weil es das Substrat ist, und Actin, weil es die MHC-Kinase-Aktivität inhibiert (Maruta et al., 1982). Die MHC-Kinase II bindet bei 4 °C an keines dieser Affinitätsmaterialien. Der Versuch, die Kinase bei Raumtemperatur zu binden wurde nicht durchgeführt, da dabei mit dem Verlust der Aktivität zu rechnen war. Die Bindungsfähigkeit der beiden Materialien wurde mit anderen Proteinen nachgeprüft: die MHC-Kinase bindet an Myosin Sepharose (Maruta et al., 1982) und das Capping-Protein vom Rinderhirn bindet an Actin-Affi-Gel (Isenberg unpubliziert).

IV.4. Stöchiometrie der Myosin-Phosphorylierung:

Myosin von aggregationsreifen Amöben wurde mit der MHC-Kinase II und gamma- ^{32}P -ATP phosphoryliert und der Einbau von ^{32}P gemessen (siehe Abbildung 9).

Wurde die Menge an inkorporiertem ^{32}P auf die nach Lowry et al. (1951) bestimmte Myosin-Menge bezogen (mit Rinderserumalbumin als Standard), erhielt man ein Verhältnis von 1 mol ^{32}P /mol schwere Kette. Wurde die Myosin-Menge aber durch quantitative Aminosäureanalyse bestimmt (Hydrolyse mit TFA/HCl, 25'), war das Verhältnis 1,8 mol ^{32}P /mol schwere Kette. Da die zweite Methode als die genauere angesehen werden kann, und insbesondere auch wegen der großen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine Myosin und

Rinderserumalbumin (siehe auch Abschnitt III.2.), gilt der zweite Wert als die bessere Bestimmung der Stöchiometrie.

IV.5. Spezifität der MHC-Kinasen:

Die Tatsache, daß Dictyostelium discoideum mehrere MHC-Kinasen hat, und daß zumindest die MHC-Kinase II nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium vorkommt, lassen die Frage nach ihrer Spezifität aufkommen:

- Phosphorylieren sie alle denselben Aminosäurerest auf der schweren Kette?
- Sind mehrere Phosphorylierungsstellen vorhanden, und wieviele?
- Erkennen die Kinasen verschiedener Entwicklungsstadien nur Myosin aus dem gleichen Stadium als Substrat an?
- Werden zellfremde Myosine als Substrate akzeptiert?

Im folgenden wird die Substratspezifität von veg. MHC-Kinase mit der von MHC-Kinase II verglichen und versucht, auf oben genannte Fragen eine Antwort zu geben.

Beide Kinasen akzeptieren Myosin aus vegetativen Zellen, als auch Myosin aus aggregationskompetenten Zellen als Substrate. Ebenfalls erkannt wird Myosin aus Plasmodien von Physarum polycephalum, welches auch in vivo auf der schweren Kette phosphoryliert wird (Schreckenbach unpubliziert). Skelettmuskel-Myosin, bei dem eine der beiden leichten Ketten in vitro und in vivo phosphorylierbar ist (Perry, 1969), wird von Dictyostelium-MHC-Kinasen nicht als Substrat erkannt (siehe Abbildung 5).

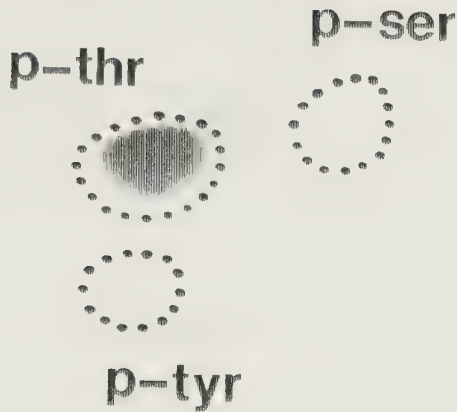


Abbildung 10: Phosphoamino säureanalyse von Dictyostelium-Myosin

Myosin von aggregationsreifen Dictyostelium Amöben wurde mit der MHC-Kinase II phosphoryliert und anschließend 2 h mit 6 N HCl hydrolysiert. Das Aminosäuregemisch wurde zweidimensional aufgetrennt (siehe Abschnitt III.8) und die Position der ^{32}P -Phosphoamino säure durch Autoradiographie bestimmt. Gezeigt ist das Autoradiogramm mit den Positionen der Phosphoamino säure=standards (punktierte Kreise). In diesem Myosin wird ausschließlich Threonin phosphoryliert.

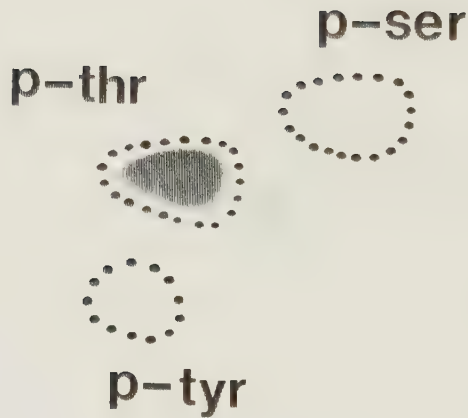


Abbildung 11: Phosphoaminosäureanalyse von Physarum-Myosin

Dieses Experiment ist identisch mit dem in Abbildung 10, nur wurde hier Myosin aus Physarum Plasmodien eingesetzt.

IV.6. Phosphoaminosäureanalyse:

Die Phosphoaminosäureanalyse von säurehydrolysiertem Myosin zeigt, daß das gesamte ^{32}P an Threonin-Reste gebunden ist (siehe Abbildung 10), wobei es keine Rolle spielt, welches Myosin und welche Kinase benutzt wurden. Die Dictyostelium-Kinasen phosphorylieren auch das Physarum-Myosin auf Threonin-Resten (siehe Abbildung 11). Dies sind die ersten Myosin-Kinasen die ihr Substrat nicht auf einem Serin-Rest phosphorylieren (siehe z. B.: Perrie et al., 1973; Côté et al., 1981).

IV.7. Phosphopeptidanalyse:

Dictyostelium-Myosin von vegetativen Amöben wurde mit der veg. MHC-Kinase oder der MHC-Kinase II phosphoryliert, mit einem Gemisch von Chymotrypsin und Trypsin vollständig verdaut, die dadurch erhaltenen Peptide zweidimensional aufgetrennt, und die Positionen der Phosphopeptide mittels Autoradiographie bestimmt (siehe Abbildung 12 A und a).

Die so erhaltenen Peptidkarten waren deckungsgleich. Das kann dadurch erklärt werden, daß entweder die Phosphorylierungsstellen gleich sind, oder die Proteasen nicht zwischen den Phosphorylierungsstellen spalten können.

Wird das Experiment mit Myosin von aggregationskompetenten Amöben wiederholt, so erhält man wieder deckungsgleiche Peptidkarten (siehe Abbildung 12 B und b). Sie sind außerdem deckungsgleich mit den Karten aus dem ersten Experiment (Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß aufgrund der methodisch bedingten und unvermeidlichen Schwankungen des Enzym-Substrat-Verhältnisses die relativen Intensitäten der Spots schwanken). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die beiden Kinasen auf beiden Myosinen die gleichen Stellen phosphorylieren.

Es wurden auch zwei Phosphopeptidkarten von Physarum-Myosin angefertigt (siehe Abbildung 12 C und c). Auch diese erwiesen sich als deckungsgleich. Um festzustellen, ob Dictyostelium- und Physarum-Myosin gemeinsame Phosphopeptide besitzen, wurde ein Gemisch von beiden Myosinen untersucht (siehe Abbildung 12 D und E). Alle Spots konnten entweder dem einen oder dem anderen Myosin zugeordnet werden, woraus geschlossen wird, daß die Aminosäuresequenzen um die Phosphorylierungsstellen der beiden Proteine nicht identisch sind.

Dieser Befund läßt die Erklärung, daß die beiden Kinasen auf einem Myosin zwei verschiedene Stellen phosphorylieren und die Proteasen nicht zwischen diesen Stellen spalten können, unwahrscheinlich erscheinen. Es muß vielmehr angenommen werden, daß beide Kinasen dieselben Stellen phosphorylieren.

IV.8. Anzahl der Phosphorylierungsstellen:

Die oben gezeigten Resultate lassen keine Aussage über die Anzahl der Phosphorylierungsstellen zu. Trotz extensiver Verdauung erhält man nicht nur einige wenige, sondern viele verschiedene Phosphopeptide. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß von zwei direkt nebeneinander liegenden Spaltstellen nur die eine schnell hydrolysiert wird: hier wirkt die Protease als Endopeptidase, während sie bei der zweiten Spaltstelle als Exopeptidase agieren müßte. Das führt zu einem Gemisch von Peptiden, die alle eine gemeinsame Aminosäuresequenz einschließen, aber verschiedene C- und N-Termini besitzen.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde mit der MHC-Kinase phosphoryliertes Dictyostelium-Myosin entweder mit Chymotrypsin oder mit Trypsin verdaut und das Peptidgemisch

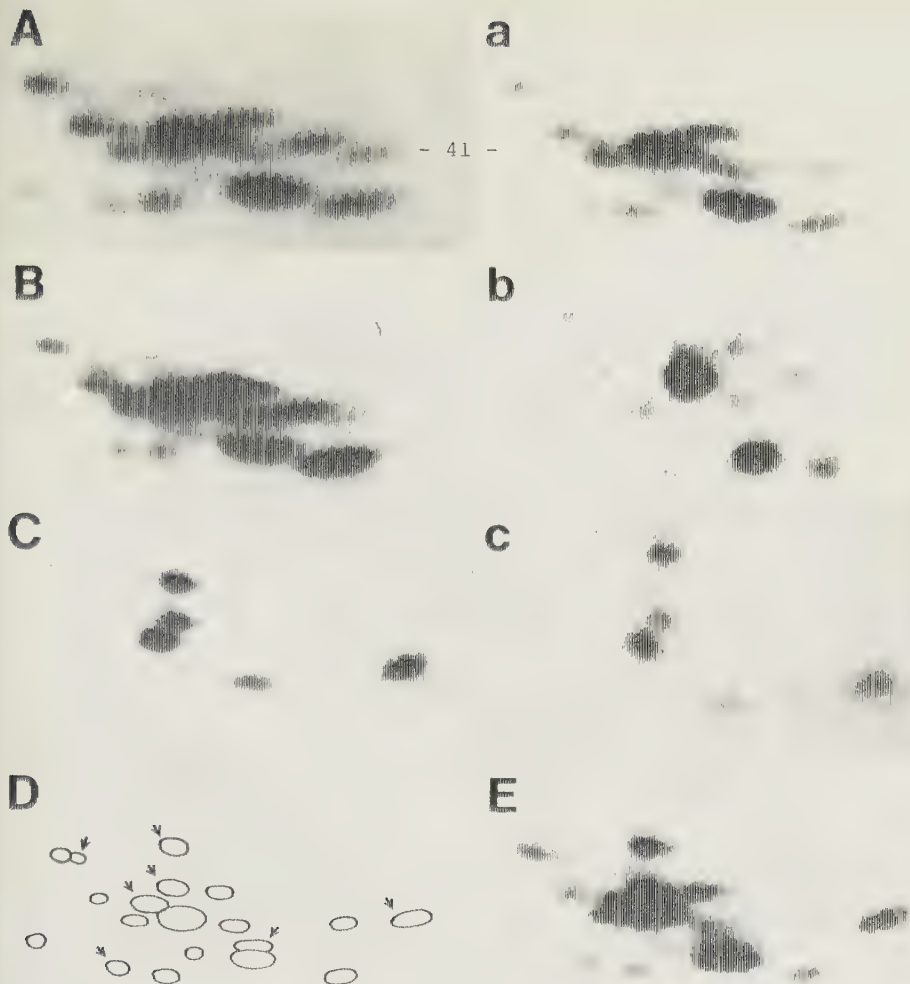


Abbildung 12: ^{32}P -Phosphopeptidkarten verschiedener Myosine, phosphoryliert mit veg. MHC-Kinase oder MHC-Kinase II

Für eine genaue Beschreibung der experimentellen Bedingungen siehe Abschnitte III.9 und IV.7.

A, B und C: veg. MHC-Kinase

a, b, c und E: MHC-Kinase II

A und a: Myosin aus vegetativen Dictyostelium Amöben

B und b: Myosin aus aggregationsreifen Dictyostelium Amöben

C und c: Myosin aus Physarum Plasmodien

D: Lageplan und E: Autoradiogramm von der Auftrennung eines Peptidgemisches von Dictyostelium- und Physarum-Myosin. Die zum Physarum-Myosin gehörenden Spots sind in D mit Pfeilen gekennzeichnet.

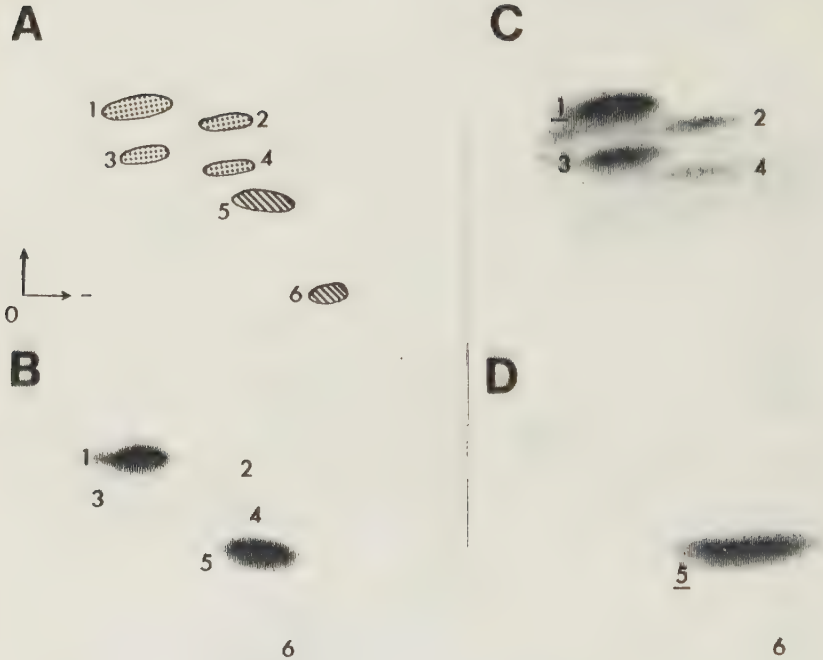


Abbildung 13: Chymotryptische ^{32}P -Phosphopeptide

Für eine detaillierte Beschreibung dieses Experiments siehe Abschnitte III.9 und IV.8.

A: Lageplan der ^{32}P -Peptide

B: Peptidgemisch nach der ersten Chymotrypsin-Behandlung

C: Spot 1 und D: Spot 5 wurden von der Platte (B) eluiert und einer zweiten Chymotrypsin-Behandlung unterzogen.

Die zu den verschiedenen Peptid-Familien gehörenden Spots sind in A verschieden schraffiert.

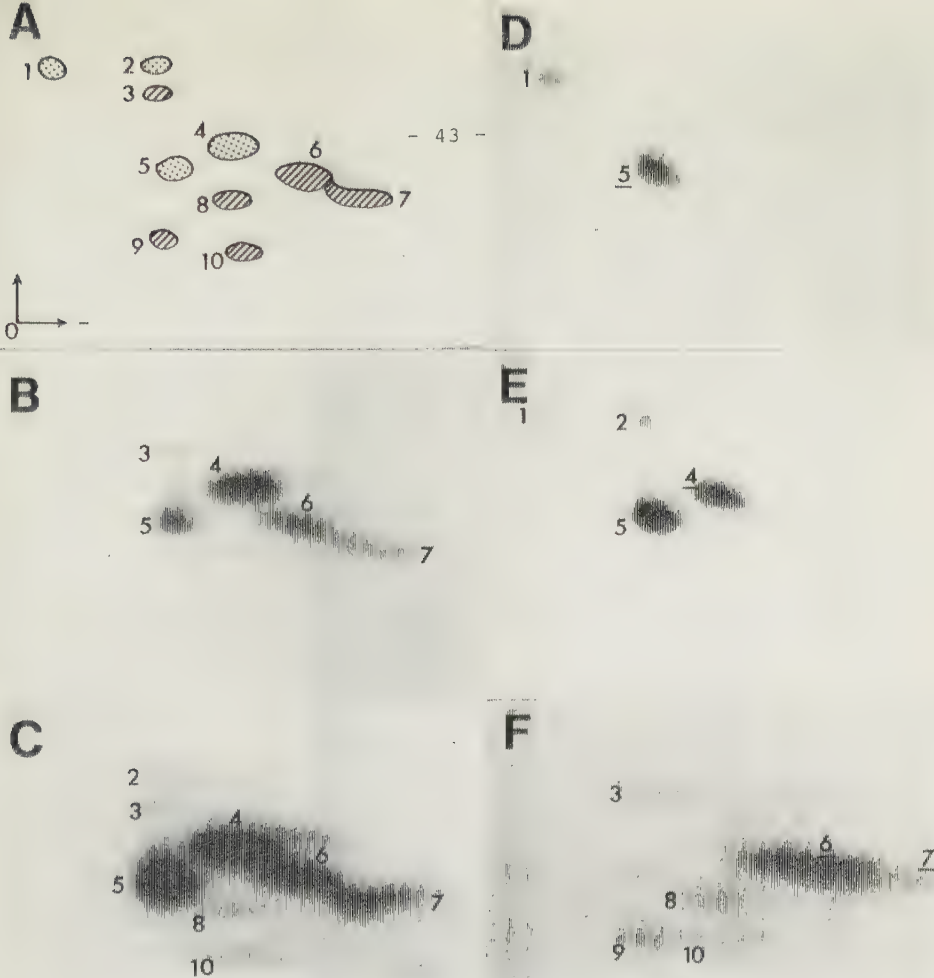


Abbildung 14: Tryptische ^{32}P -Phosphopeptide

Dies ist das gleiche Experiment wie in Abbildung 13, nur wurde hier anstelle des Chymotrypsin Trypsin eingesetzt.

A: Lageplan der ^{32}P -Peptide

B und C: Peptidgemisch nach der ersten Trypsin-Behandlung; es wurden zwei verschiedene Mengen aufgetragen um auch schwach radioaktive Spots sichtbar zu machen.

D: Spot 5, E: Spot 4 und F: Spots 6 und 7 wurden von den Platten eluiert und nochmals mit Trypsin verdaut.

zweidimensional aufgetrennt (siehe Abbildungen 13 und 14). Die am stärksten radioaktiv markierten Spots ("Hauptspots") wurden von der Dünnschichtplatte eluiert, nochmals einer Verdauung mit der gleichen Protease unterzogen und analysiert.

Nach der Verdauung mit Chymotrypsin wurden neben einigen kleinen Spots zwei Hauptspots erhalten (siehe Abbildung 13 B). Diese wurden von der Platte eluiert und erneut mit dem Enzym behandelt. Es zeigt sich, daß beide weiter gespalten werden konnten, aber keine gemeinsame Spaltprodukte hatten (siehe Abbildungen 13 C und D). Alle ^{32}P -Chymotrypsin-Fragmente konnten so zwei Familien zugeordnet werden, von denen anzunehmen ist, daß sie nicht dieselbe Aminosäuresequenz repräsentieren (siehe Abbildung 13 A).

Nach der Trypsin-Verdauung wurden vier Hauptspots erhalten (siehe Abbildungen 14 B und C). Spots 4 und 5 wurden einzeln weiter untersucht, und Spots 6 und 7 - wegen ihrer schlechten Trennung voneinander - zusammen (siehe Abbildungen 14 D, E und F). Wieder erhielt man zwei Familien von ^{32}P -Peptiden.

IV.9. Eigenschaften großer phosphorylierter Myosin-Fragmente:

Nachdem festgestellt wurde, daß möglicherweise zwei verschiedene Phosphorylierungsstellen auf dem Dictyostelium-Myosin existieren, wurden auch Phosphopeptidkarten von Myosin-Fragmenten (38 kd, 40 kd, 85 kd und 132 kd; siehe Abbildung 15) angefertigt, die durch begrenzte Chymotrypsin-Verdauung erhalten worden waren. Dabei waren zwischen dem intakten Myosin und den vier Fragmenten keine Unterschiede festzustellen. Daraus kann geschlossen werden, daß die beiden Phosphorylierungsstellen nicht weiter als 38 kd voneinander entfernt auf der schweren Kette liegen.

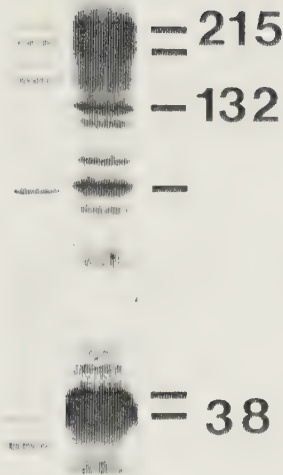


Abbildung 15: SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese und Autoradiogramm von Myosin-Fragmenten

Myosin wurde mit der MHC-Kinase phosphoryliert und einer limitierten Chymotrypsinspaltung unterzogen (siehe Abschnitt III.10). Die so erhaltenen Fragmente wurden auf einem SDS-Polyakrylamid Gel (12 %) voneinander getrennt. Im linken Teil der Abbildung ist das mit Coomassie-Blau angefärbte Gel, und im rechten Teil das Autoradiogramm zu sehen. Die Markierungen am rechten Rand kennzeichnen die ausgeschnittenen Fragmente von 38 kD, 40 kD, 85 kD, 132 kD und 180 kD. Die Bande mit dem Molekulargewicht 215 kD ist die intakte schwere Kette des Myosin .

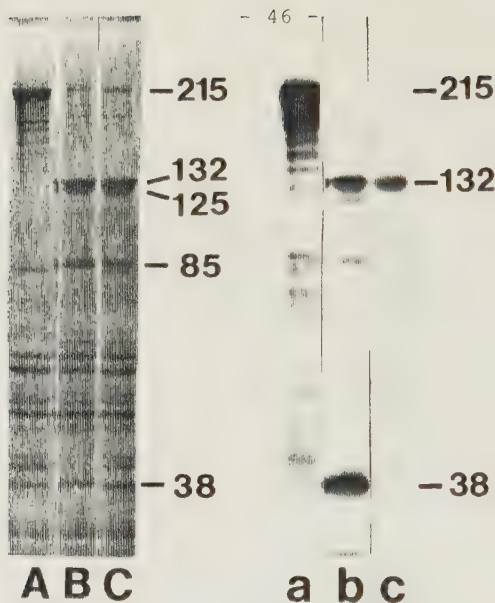


Abbildung 16: SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese und Autoradiogramme von Myosin und Myosin-Fragmenten

Myosin wurde wie in Abbildung 15 behandelt, nur war hier die Inkubationstemperatur 35 °C anstelle von 25 °C, was sich dadurch bemerkbar macht, daß fast ausschließlich die ^{32}P -Peptide mit den Molekulargewichten 132 und 38 kd entstehen.

A,B und C: mit Coomassie-Blau angefärbte Gele

a,b und c: Autoradiogramme

A und a: intaktes Myosin

B und b: Myosin wurde zuerst phosphoryliert und dann gespalten

C und c: Myosin wurde zuerst gespalten und dann phosphoryliert

Das 38 kd-Fragment des Myosin wird auf diesen Gelen von einem Polypeptid aus der Kinase Fraktion überlagert. Deshalb sind zwischen dem ersten und den beiden anderen Gelen bei dieser Bande keine Unterschiede in der Intensität festzustellen.

Bei einem anderen Experiment wurde Myosin zuerst mit Chymotrypsin behandelt, um dann erst phosphoryliert zu werden. Dabei stellte sich heraus, daß das 38 kd Peptid, welches beide Phosphorylierungsstellen enthält, nicht mehr von der MHC-Kinase II als Substrat erkannt wird (siehe Abbildung 16). Dies kann durch den Verlust der Erkennungsstelle oder auch der nötigen Tertiärstruktur bedingt sein.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Myosin-Phosphorylierung in Dictyostelium discoideum untersucht. Dabei wurden Myosine und Myosin-Kinasen aus vegetativen und aggregationskompetenten Amöben eingesetzt.

Obwohl zur Reinigung von Myosin aus vegetativen und aus aggregationsreifen Amöben verschiedene Methoden nötig waren, scheint es sich in beiden Fällen um ein und dasselbe Protein zu handeln, da in den Molekulargewichten der einzelnen Ketten und im elektrophoretischen Verhalten größerer und kleinerer Chymotrypsin-Fragmente keine Unterschiede festzustellen waren.

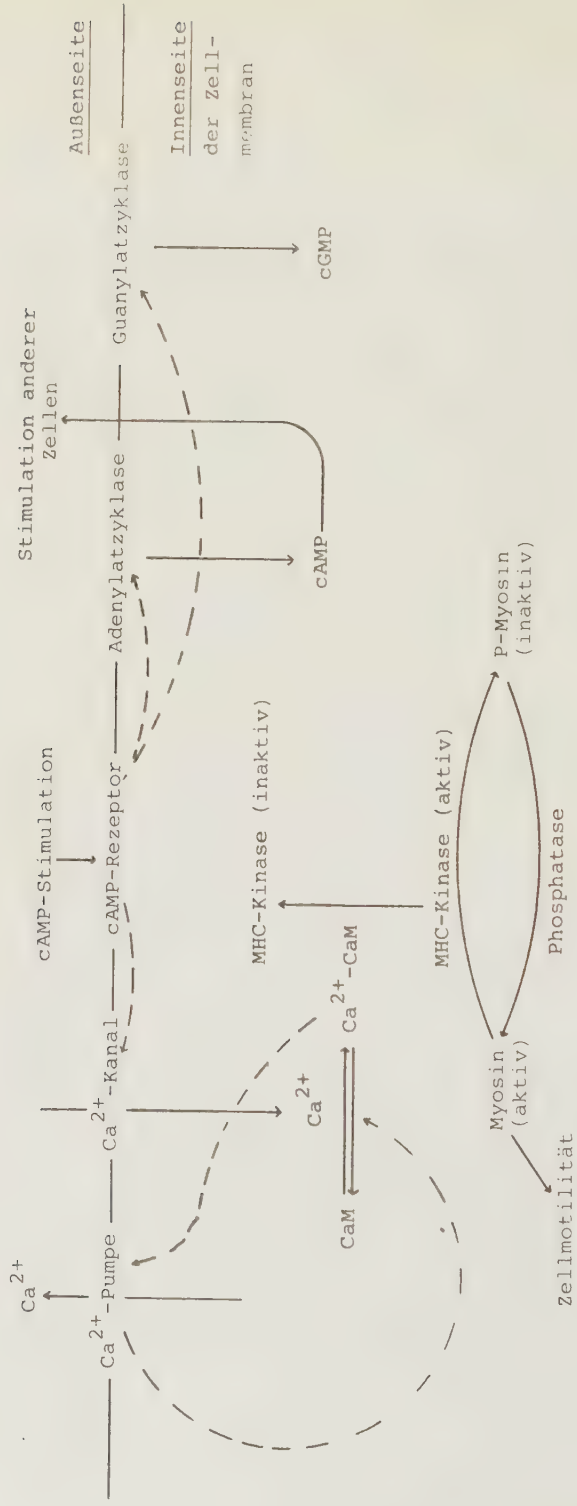
Das unterschiedliche Verhalten des Myosins während der Aufarbeitung aus Zellen der beiden Entwicklungsstadien ist wahrscheinlich auf das Ausmaß der Phosphorylierung der schweren Ketten zurückzuführen: Myosin aus vegetativen Amöben ist voll phosphoryliert (Maruta et al., 1982), Myosin aus aggregationskompetenten Amöben enthält keine Phosphatgruppen. Im phosphorylierten Zustand bildet Myosin keine Filamente und besitzt daher eine wesentlich höhere Löslichkeit.

Mit Hilfe von Phosphopeptidkarten und Phosphoamino-säureanalysen wird hier gezeigt, daß Kinasen von Amöben beider Entwicklungsstadien - veg. MHC-Kinase und MHC-Kinase II - Dictyostelium-Myosin innerhalb derselben Sequenzabschnitte auf Threonin-Resten phosphorylieren. Ob es sich dabei auch um dieselben Threonin-Reste handelt, ist nur durch eine Sequenzanalyse festzustellen. Da aber auch die Auswirkungen der Phosphorylierung durch die Kinasen (die Hemmung der Filamentbildung und der Actin-Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase) (Kuczmarski und Spudich, 1980; Maruta et al., 1983) in beiden Fällen dieselben sind ist anzunehmen, daß es sich auch um die Phosphorylierung derselben Threonin-Reste handelt.

Bei den beiden Kinasen hingegen handelt es sich um verschiedene Proteine. Sowohl in ihrem chromatographischen Verhalten, als auch in der Abhängigkeit ihrer Aktivitäten von Ca^{2+} unterscheiden sie sich wesentlich: Die veg. MHC-Kinase bindet an Myosin-Sepharose, an Calmodulin-Sepharose und an Histon-Sepharose und ihre Aktivität ist Ca^{2+} -unabhängig; MHC-Kinase II bindet an keines dieser Affinitätsmaterialien und wird durch Ca^{2+} /Calmodulin inaktiviert (Maruta et al., 1982). MHC-Kinase II konnte nur aus aggregationskompetenten Zellen isoliert werden.

Es ist bekannt, daß sowohl vegetative, als auch aggregationskompetente Dictyostelium-Zellen chemotaktisch reagieren, wobei im ersten Fall Folsäure, und im zweiten Fall zyklisches AMP die in der Natur vorliegenden Lockstoffe sind (Pan et al., 1975; Konijn et al., 1967). Unmittelbar nach der chemotaktischen Stimulation steigt in beiden Fällen die intrazelluläre Konzentration von zyklischem GMP stark an (Wurster et al., 1977; Mato et al., 1977). Ebenfalls in beiden Fällen werden Inaktivatoren für beide Lockstoffe (Phosphodiesterase für zyklisches AMP und Folatdeaminase für Folsäure) in den extrazellulären Raum abgesondert. Bei Untersuchungen dieser Vorgänge kamen Bernstein et al. (1981) zu dem Schluß, daß bei Stimulation durch beide Lockstoffe dieselben Mechanismen der Signalübertragung ins Zellinnere aktiv werden. Auch die Ca^{2+} -Konzentration steigt nach der chemotaktischen Stimulation an. Obwohl dies nur bei aggregationsreifen Amöben nachgewiesen wurde (Wick et al., 1978), darf man annehmen, daß das auch für vegetative Dictyostelium-Zellen gilt.

Einer der Angriffspunkte des durch die Membran übertragenen Signals ist die Myosin-Kinase II. Malchow et al. (1981) haben gezeigt, daß in aggregationsreifen Amöben die chemotaktische Stimulierung durch zyklisches AMP oder Folsäure in der Akkumulation minder-phosphorylierten Myosins resultiert, was durch die Inaktivierung der MHC-Kinase II bei erhöhter



(nach Maruta, unpubliziert)

Abbildung 17: Chemotaktische Signalübertragung bei Dictyostelium discoideum

Ca^{2+} -Konzentration erklärt werden kann. Daraus kann geschlossen werden, daß die MHC-Kinase II an der chemotaktischen Antwort beteiligt ist.

Da zu vermuten ist, daß bei Zellen beider Entwicklungsstadien die ersten Schritte der Signalübertragung die gleichen sind, und bei aggregationskompetenten Amöben die Ca^{2+} -sensitive MHC-Kinase II an der Chemotaxis beteiligt zu sein scheint, ist anzunehmen, daß auch bei vegetativen Amöben die Myosin-Phosphorylierung durch die Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird. Da die veg. MHC-Kinase nicht durch Ca^{2+} inaktiviert wird, stellt sich die Frage, ob nicht eine durch Ca^{2+} stimulierte Myosin-Phosphatase an der Myosin-Regulation beteiligt ist. Wäre dies der Fall, wäre die Auswirkung einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Zellen beider Entwicklungsphasen dieselbe.

Bei allen bisher untersuchten Fällen der Myosin-Phosphorylierung handelt es sich um die Serin-Phosphorylierung (Perrie et al., 1973; Côté et al., 1981). Bei Dictyostelium-Myosin tragen Threonin-Reste die Phosphatgruppen. Da die Phosphorylierung von Physarum-Myosin durch Dictyostelium-Kinasen ebenfalls auf Threonin-Resten stattfindet, stellt sich die Frage, ob diese MHC-Kinasen Threonin-spezifisch sind. Um dies zu klären wäre es nötig, zu untersuchen, ob der Austausch dieser Threonin-Reste die Phosphorylierbarkeit beeinträchtigt. Würden die Kinasen diese modifizierten Peptide nicht als Substrat akzeptieren, wären sie die ersten Beispiele für Threonin-spezifische Kinasen.

Außer der soeben erwähnten Threonin-Phosphorylierung gleicht die Myosin-Phosphorylierung in Dictyostelium der in Acanthamoeba castellanii: Auch beim Acanthamoeba-Myosin II werden die Phosphatgruppen ins Schwanzende der schweren Kette eingebaut, mit der gleichen daraus resultierenden Hemmung der Aktivierbarkeit der Mg^{2+} -ATPase des Myosins. Bei in vivo phosphoryliertem Acanthamoeba-Myosin wurden zwei Phosphory-

lierungsstellen nachgewiesen, bei in vitro Experimenten jedoch drei. Da bei diesen Versuchen eine recht unreine Kinase eingesetzt wurde (Côté et al., 1981), ist noch offen, ob es sich bei der dritten um eine physiologisch bedeutsame Phosphorylierungsstelle oder um ein Artefakt handelt.

Was die Anzahl der Phosphorylierungsstellen beim Dictyostelium-Myosin anbelangt, ist auch hier diese Frage nicht endgültig geklärt. Die Phosphopeptidkarten zeigen zwei verschiedene "Familien" von Peptiden, was auf zwei verschiedene Phosphorylierungsstellen hinweist. Hier ergeben sich zwei Möglichkeiten:

- Die beiden Stellen liegen auf ein und derselben schweren Kette: in diesem Fall wäre es notwendig zu zeigen, daß mehr als ein, aber nicht mehr als zwei mol ^{32}P /mol schwere Kette eingebaut werden können.
- Die beiden Stellen liegen nicht auf derselben Kette: Dann dürfte maximal ein mol ^{32}P /mol schwere Kette eingebaut werden können.

Dieser Fall könnte dann eintreten, wenn Dictyostelium-Myosin in Form zweier Isozyme vorliegen würde, oder wenn sich die beiden schweren Ketten eines Myosin-Moleküls voneinander unterscheiden. Es gibt zur Zeit keinen soliden Hinweis auf die Existenz zweier verschiedener Formen der Peptide, doch ist diese Möglichkeit nicht auszuschließen, zumal - wegen der großen Homologie, die zwischen diesen Peptiden bestehen muß - der Nachweis einer Verschiedenheit äußerst schwierig zu erbringen wäre.

Um dieses Problem weiter zu untersuchen, wurde die Menge an inkorporiertem ^{32}P bestimmt. Bezieht man die erhaltenen Meßergebnisse auf die nach Lowry bestimmte Menge an Myosin, so erhält man einen Wert von 1 mol ^{32}P /mol schwere Kette. Wegen der großen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung zwischen dem Myosin und dem als Standard verwendeten Rinderserumalbumins, wurde die Myosin-Menge zu=

sätzlich durch eine quantitative Aminosäureanalyse bestimmt. Hier ergibt sich eine Stöchiometrie von 1,8 mol ^{32}P /mol schwere Kette. Jeder der beiden Werte spricht für eine der obengenannten Möglichkeiten.

Die Proteinbestimmung nach Lowry unterliegt einer Vielzahl von Einflüssen, bedingt durch die Zusammensetzung des Proteins und durch andere Faktoren wie Salze, SDS usw.. Aus diesem Grund wird diese Methode im allgemeinen auch nur für relative Bestimmungen eingesetzt. Die Aminosäureanalyse unterliegt weniger diesen Einflüssen. Auch hier ist die Zusammensetzung des Proteins von Bedeutung, da zum Beispiel in Wasser weniger lösliche Proteine selbst in 6 N HCl wenig löslich sind. Um diesem Problem auszuweichen, wurden hier zwei verschiedene Methoden der Hydrolyse angewandt:

- Trifluoressigsäure/HCl 1:2, 160 °C, 25 und 50',
- 6 N HCl, 110 °C, 24 h und 48 h.

Die Ergebnisse dieser Analysen stimmen weitgehend überein. Sie zeigen, daß die Hydrolyse vollständig verlief und dadurch nicht zuwenig Protein gemessen wurde. Da somit die individuelle Zusammensetzung des Myosins berücksichtigt wurde, ist anzunehmen, daß die Hydrolyse-Methoden bessere Werte als die Proteinbestimmung nach Lowry angeben. Somit gilt die erste der obengenannten Möglichkeiten als die richtige.

Vergleicht man die Myosin-Phosphorylierung in den verschiedenen Zellsystemen miteinander, so stellt man fest, daß zwischen Vertebratenzellen auf der einen Seite, und Amöben auf der anderen grundlegende Unterschiede bestehen (siehe Tabelle):

- Im ersten Fall wird immer eine Phosphatgruppe in die leichte Kette - also in den Myosinkopf - eingebaut und dadurch die Aktivierbarkeit der Mg^{2+} -ATPase durch Actin und die Filamentbildung stimuliert.
- Im zweiten Fall werden mehrere Stellen am Schwanzende der schweren Kette phosphoryliert und dadurch die Actin-Aktivier=

Phosphorylierungsstellen und Auswirkung der Phosphorylierung
Einfluß von Ca^{2+} /Calmodulin

	Myosin-Typ	Stelle	Actin-aktiv. Mg^{2+} -ATPase	Myosin-Filament Bildung	Auswirkung von Ca^{2+} /Calmodulin
1.	Skelett-Muskel Myosin	leichte Kette 20 kd	keine Ausw.	keine Ausw.	Aktivierung
2.	Glatt-Muskel Myosin	leichte Kette 20 kd	Stimulation	Stimulation	Aktivierung
3.	Acanthamoeba Myosin Ia Myosin Ib	schwere Kette 130 kd 125 kd	Stimulation	keine Ausw.	keine Ausw.
4.	Acanthamoeba Myosin II	schwere Kette 170 kd	Inhibierung	keine Ausw.	keine Ausw.
5.	Dictyostelium Myosin	schwere Kette 215 kd	Inhibierung	Inhibierung	Inaktivierung

ung der Mg^{2+} -ATPase und die Filamentbildung inhibiert. Eine Ausnahme bilden die Acanthamoeba-Myosine Ia und Ib: Ihre schweren Ketten sind viel kürzer als die der anderen Myosine und besitzen deswegen keinen Schwanz. Die Phosphorylierung findet auf der schweren Kette statt - hier aber im Kopfbereich - und führt zu einer Stimulation der Actomyosin Mg^{2+} -ATPase-Aktivität.

Obwohl sich die Eigenschaften der Myosine aus dem glatten Muskel und aus Dictyostelium verschieden zueinander verhalten, führt eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in beiden Systemen zum gleichen Resultat, nämlich der Aktivierung der Actin-Myosin Interaktionen und der Filamentbildung des Myosins.

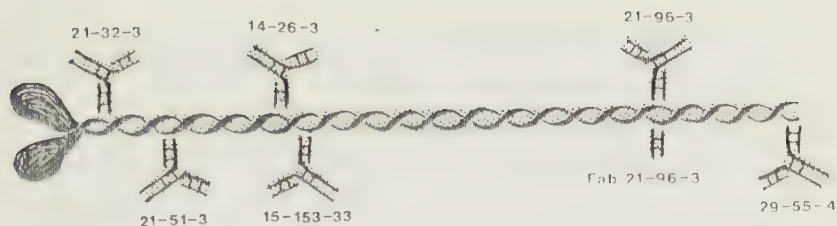
VI. ANHANG

Wie schon in der Einleitung angedeutet wurde, soll diese Arbeit die Grundlage für das weitere Studium der Rolle des Myosins bei der Zellbewegung während der Chemotaxis bei Dictyostelium discoideum sein. Dabei wurde auch der Einsatz von Antikörpern zur Lokalisierung von Molekülen, oder zur Hemmung von Reaktionen innerhalb der Zelle vorgeschlagen. Inzwischen ist es gelungen, mehrere monoklonale Antikörper gegen Dictyostelium-Myosin zu erhalten. Ihre Bindungsstellen auf dem Myosin-Molekül konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestimmt werden (siehe Abbildung 18). Besondere Aufmerksamkeit verdient der Antikörper 21-96-3, der an das 38 kd-Fragment bindet, das beide Phosphorylierungsstellen enthält. Ob die Antikörper die Phosphorylierung hemmen, wird noch untersucht. Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits publiziert (Claviez et al., 1982).

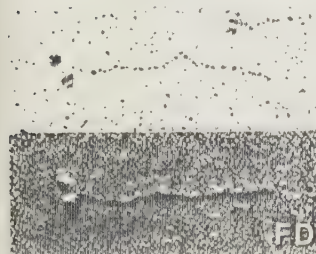
Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Myosin-Antikörper-Komplexen (siehe nächste Seite)

Die Abbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von an Myosin gebundenen monoklonalen Antikörpern. In dem Schema sind die Bindungsstellen auf einem Myosin-Molekül dargestellt. Der Antikörper 21-96-3 bindet an das 38 kd-Peptid, welches beide Phosphorylierungsstellen enthält.

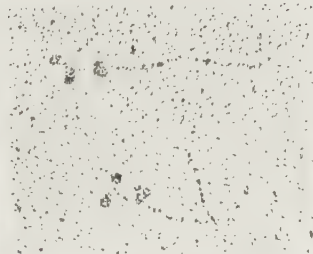
Da der Antikörper 29-55-4 an das äußerste Schwanzende bindet, wurde mit Hilfe eines monovalenten Antikörperfragmentes (Fab 21-96-3) die Polarität des Myosin-Antikörper-Komplexes festgestellt (siehe unteren Bildteil: Schema und elektronenmikroskopische Aufnahmen).



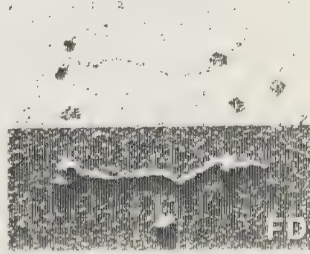
Kontrolle



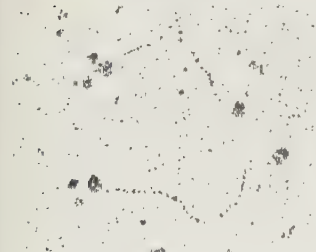
21-51-3



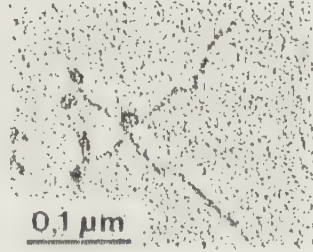
21-96-3



21-32-3



14-26-5



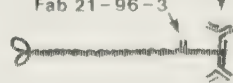
(15-153-33) + (21-96-3)



29-55-4



Fab 21-96-3



VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adelstein, R.S., und Conti, M.A. (1975) "Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity", *Nature* 256: 597-598
- Adelstein, R.S., und Eisenberg, E. (1980) "Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction", *Ann. Rev. Biochem.* 49:921-956
- Bernstein, R.L., Rossier, C., Van Driel, R., Brunner, M., und Gerisch, G. (1981) "Folate deaminase and cyclic AMP phosphodiesterase in *Dictyostelium discoideum*: their regulation by extracellular cyclic AMP and folic acid", *Cell Diff.* 10: 79-86
- Bonner, J.T., Hall, E.M., Noller, S., Oleson, F.B., und Roberts, A.B. (1972) "Synthesis of cyclic AMP and phosphodiesterase in various species of cellular slime molds and its bearing on chemotaxis and differentiation", *Dev. Biol.* 29: 402-409
- Brunette, D.M., und Till, J.E. (1971) "A rapid method for the isolation of L-cell surface membranes using an aqueous two-phase polymer system", *J. Membrane Biol.* 5: 215-224
- Clarke, M., und Spudich, J.A. (1974) "Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells", *J. Mol. Biol.* 86: 209-222
- Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H., Baltes, W., Fischer, P., und Gerisch, G. (1982) "Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of *Dictyostelium*-myosin", *EMBO-J.* 1: 1017-1022

- Collins, J.H., Côté, G., und Korn, E.D. (1982) "Localisation of three phosphorylation sites on each heavy chain of Acanthamoeba myosin II to a segment at the end of the tail", J. Biol. Chem. 257: 4529-4534
- Collins, J.H., und Korn, E.D. (1980) "Actin activation of Ca^{2+} -sensitive Mg^{2+} -ATPase of Acanthamoeba myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains", J. Biol. Chem. 255: 8011-8014
- Côté, G.P., Collins, J.H., und Korn, E.D. (1981) "Identification of three phosphorylation sites on each heavy chain of Acanthamoeba myosin II", J. Biol. Chem. 256: 12811-12816
- Dayhoff, M.O. (1976) "Atlas of protein sequence and structure", Volume 5, Supplement 2, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA
- Edman, P., und Henschen, A. (1975) in "Protein sequence determination", Editor Needleman, S.B., Springer Verlag, N.Y., 232
- Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A., und Wick, U. (1975) "Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating Dictyostelium cells", Nature 255: 547-549
- Gordon, D.J., Eisenberg, E., und Korn, E.D. (1976) "Characterization of cytoplasmic actin isolated from Acanthamoeba castellanii by a new method", J. Biol.Chem. 251: 4778-4786
- Gracy, R.W. (1977) "Two dimensional thin layer methods", Methods of Enzymology 47: 195-204

- Hathaway, D.R., und Adelstein, R.S. (1979) "Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1653-1657
- Hunter, T., und Sefton, B.M. (1980) "Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1311-1315
- Konijn, T.M., van de Meene, J.G.C., Bonner, J.T., und Barkley, D.S. (1967) "The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 1152-1154
- Kuczmarski, E.R., und Spudich, J.A. (1980) "Regulation of myosin self-assembly: Phosphorylation of Dictyostelium heavy chain inhibits formation of thick filaments", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7292-7296
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature 227: 680-682
- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G., und Baker, H. (1969) "Substructure of the myosin moleküle", J. Mol. Biol. 42: 1-29
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951) "Protein mesurement with the folin phenol reagent", J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Mabuchi, I., und Okuno, M. (1977) "The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres", J. Cell Biol. 74: 251-263

- Malchow, D., Böhme, R., und Rahmsdorf, H.J. (1981)
"Regulation of phosphorylation of myosin heavy chain during the chemotactic response of Dictyostelium cells", Eur. J. Biochem. 117: 213-218
- March, S.C., Parikh, J., und Cuatrecasas, P. (1974) "A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography", Anal. Biochem. 60: 149-152
- Martin, J.B., und Doty, D.M. (1949) "Determination of inorganic phosphate- modification of isobutyl alcohol procedure", Anal. Chem. 8: 965-967
- Maruta, H., Baltes, W., Dieter, P., Marmé, D., und Gerisch, G. (1983) "Myosin heavy chain kinase inactivated by Ca^{2+} /Calmodulin from aggregating cells of Dictyostelium discoideum", EMBO J., in press
- Maruta, H., Baltes, W., Gerisch, G., Dieter, P., und Marmé, D. (1982) "Signal transduction in chemotaxis of Dictyostelium discoideum: Role of Ca^{2+} and calmodulin in the regulation of myosin heavy chain kinases and other protein kinases", in "Plasma= lemma and Tonoplast: Their fuction in the plant cell", (Marmé, D., Marre, E., und Hertel, R. Editoren) Elsevier Biomedical Press
- Maruta, H., und Korn, E.D. (1977) "Acanthamoeba cofactor protein is a heavy chain kinase required for actin activation of the Mg^{2+} -ATPase activity of Acanthamoeba myosin I", J. Biol. Chem. 252: 8329-8332

- Maruta, H., und Korn, E.D. (1981) "Proteolytic separation of the actin-activatable ATPase site from the phosphorylation site on the heavy chain of Acanthamoeba myosin Ia", J. Biol. Chem. 256: 503-506
- Mato, J.M., Krens, F.A., Van Haastert, P.J.M., und Konijn, T.M. (1977) "3':5'-cyclic AMP dependent 3':5'-cyclic GMP accumulation in Dictyostelium discoideum", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2348-2351
- Morgan, M., Perry, S.V., und Ottaway, J. (1976) "Myosin light chain phosphatase", Biochem. J. 157: 687-697
- Pan, P., Hall, E.M., und Bonner, J.T. (1975) "Determination of the active portion of the folic acid molecule in cellular slime mold chemotaxis", J. Bacteriol. 122: 185-191
- North, M.J., und Harwood, J.M. (1979) "Multiple acid proteinases in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum", Biochem. Biophys. Acta 566: 222-233
- Peltz, G., Kuczmarski, E.R., und Spudich, J.A. (1981) "Dictyostelium myosin: Characterization of chymotryptic fragments and localization of the heavy chain phosphorylation site", J. Cell Biol. 89: 104-108
- Perrie, W.T., Smillie, L.B., und Perry, S.V. (1972) "A phosphorylated light chain component of myosin", Biochem. J. 128: 105p-106p

- Perrie, W.T., Smillie, L.B., und Perry, S.V. (1973) "A phosphorylated light chain component of myosin from skeletal muscle", *Biochem. J.* 135: 151-164
- Pollard, T.D., und Korn, E.D. (1973) "Acanthamoeba myosin", *J. Biol. Chem.* 248: 4682-4690
- Pollard, T.D., Thomas, S.M., und Niedermann, R. (1974) "Human platelet myosin: I: Purification by a rapid method applicable to other non-muscle cells", *Anal. Biochem.* 60: 258-266
- Rahmsdorf, H.J., Malchow, D., und Gerisch, G. (1978) "Cyclic AMP induced phosphorylation in Dictyostelium of a peptide comigrating with myosin heavy chains", *FEBS-Lett.* 88: 322-326
- Scholey, J.M., Taylor, K.A., und Kendrick-Jones, J. (1980) "Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin dependent light chain kinase", *Nature* 287: 233-235
- Stull, J.T., und Buss, J.E. (1977) "Phosphorylation of cardiac troponin by cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase", *J. Biol. Chem.* 252: 851-857
- Trooter, J.A., und Adelstein, R.S. (1979) "Macrophage myosin: regulation of actin-activated ATPase activity by phosphorylation of the 20.000 dalton light chain", *J. Biol. Chem.* 254: 8781-8785
- Tsugita, A., und Scheffler, J.-J. (1982) "A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid", *Eur. J. Biochem.* 124: 585-588

- Watts, D.J., und Ashworth, J.M. (1970) "Growth of myxamoebae of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum in axenic culture", Biochem. J. 119: 171-174
- Wick, U., Malchow, D., und Gerisch, G. (1978) "Cyclic-AMP stimulated calcium influx into aggregating cells of Dictyostelium discoideum", Cell Biol. Intern. Rep. 2: 71-79
- Wurster, B., Schubinger, K., Wick, U., und Gerisch, G. (1977) "Cyclic GMP in Dictyostelium discoideum", FEBS-Lett. 76: 141-144

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSA	Rinderserumalbumin
d	Dalton
DTT	1,4-Dithiothreit
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis-(β -aminoäthyl Äther)N,N'-tetraessigsäure
MHC-Kinase	Myosin-schwere-Kette-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	pounds per square inch (= 0,07 kg/cm ²)
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Laurylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
veg. MHC-Kinase	Myosin-schwere-Kette-Kinase aus vegetativen <u>Dictyostelium</u> -Amöben

IX. LEBENS LAUF

Name	Wolfgang Baltes
Geburtsdatum	14. April 1955
Geburtsort	Saarbrücken
Eltern	Anton Baltes, Kaufmann Anneliese Baltes, geb. Hornung
1960 - 1964	Volksschule Merzig/Saar
1964 - 1973	Deutsch-Französisches-Gymnasium Saarbrücken
1973	Abitur
1973 - 1974	Bundeswehrdienst
1974 - 1976	Studium der Naturwissenschaften an der Université des Sciences et Techniques du Languedoc in Montpellier (Frankreich)
Juli 1976	Vordiplom (Diplôme des Etudes Universitaires Générales A)
1976 - 1979	Ingenieurstudium an der Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier
Juli 1979	Ingenieurdiplom
1979 - 1982	Promotion unter Anleitung von Prof. Gerisch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München

Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden mit
Zustimmung des Betreuers bereits veröffentlicht:

- Maruta et al., 1982
- Maruta et al., 1983 (siehe Literaturliste)

